



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**IZOLACE A CHARAKTERIZACE PŘÍRODNÍCH AKTIVNÍCH
LÁTEK A MOŽNOSTI JEJICH APLIKACE PŘI PŘÍPRAVĚ
DOPLŇKŮ STRAVY**

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NATURAL ACTIVE COMPONENTS AND THEIR APPLICATION
IN FOOD SUPPLEMENTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Šmídová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1412/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Veronika Šmídová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Izolace a charakterizace přírodních aktivních látek a možnosti jejich aplikace při přípravě doplňků stravy

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Výběr, charakterizace a izolace přírodních aktivních látek
- 2) Enkapsulace zvolených aktivních látek a jejich směsí
- 3) Návrh optimálního složení dětských doplňků stravy s obsahem zvolených aktivních látek

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Veronika Šmídová
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zaměřuje na charakterizaci a izolaci přírodních aktivních látek, a to zejména lipofilního charakteru. Další část práce je zaměřena na enzymy a jejich enkapsulaci do alginátových částic pro následné navržení enzymatického doplňku stravy s optimálním složením pro děti.

Teoretická část práce se zaměřuje primárně na problematiku dětské výživy již od útlého věku, tedy na nezbytné živiny, které dítě musí přijímat, aby mohlo bezproblémově růst. Také se zabývá dostupností enzymatických doplňků stravy pro děti. Na závěr se teoretická část zabývá nedostatkem vybraných přírodních látek a jejich působením v souvislosti s nádorovými onemocněními.

V experimentální části byly charakterizovány čtyři druhy olejnatých semen, respektive olejů, získaných z těchto semen. Oleje byly získávány dvěma metodami, a to lisováním za studena na kuchyňské lisu Yoda a extrakcí v organickém rozpouštědle na automatickém přístroji Soxtherm. Jednalo se o římský kmín, lněná, sezamová a dýňová semínka. U takto získaných olejů proběhla charakterizace přírodních aktivních látek, konkrétně celkového obsahu fenolických sloučenin, flavonoidů, antioxidačních látek, karotenoidů, chlorofylů a mastných kyselin. Z vybraných extraktů byly dále připraveny liposomy, u nichž byl pozorován vliv na nádorové střevní buňky. V neposlední řadě byly vybrány enzymy, které byly enkapsulovány do alginátových částic o průměru 450 μm a byla zkoumána například proteolytická aktivita daných enkapsulovaných enzymů po působení modelových trávicích šťáv.

Poslední část práce byla zaměřena na optimalizaci kompletního doplňku stravy s přídatkem alginátových částic jako nosičů enzymů. Takto připravené vzorky doplňků stravy byly podrobeny senzorické analýze.

KLÍČOVÁ SLOVA

Enkapsulace, dětská výživa, mastné kyseliny, alginát, enzymy

ABSTRACT

The diploma thesis is focused on the characterisation and isolation of naturally occurred active compounds, especially on lipophilic compounds. The next part of the thesis deals with enzymes and their encapsulation into alginate particles to suggest new enzymatic dietary supplement for children with optimal nutrient composition.

The theoretical part is focused on the issue of child nutrition, accordingly the necessary nutrients that children need to grow without any health difficulties. It is also focused on the availability of enzymatic food supplements for children. Finally, the theoretical part deals with the lack of chosen natural substances and their effects in connection with cancer.

In the experimental part, four types of oils obtained from seeds were characterized. The oils were obtained by two methods: cold pressing with a Yoda kitchen press and extraction in an organic solvent with Soxtherm. Seeds were linseed, sesame, pumpkin, and cumin. With these oils were characterized natural active substances, polyphenols, flavonoids, antioxidants, carotenoids, chlorophylls, and fatty acids. Liposomes were also prepared from selected extracts, in which an effect on intestinal tumour cells were observed. Furthermore, some enzymes were selected, and they were encapsulated into alginate particles with average size 450 µm. In these particles was specified encapsulation efficiency as well as the proteolytic activity after testing in digest juices.

The last part of this thesis was focused on the optimization of a complete enzymatic food supplement with addition of alginate particles as enzyme carriers. Samples of these supplements were finally subjected to a sensory analysis.

KEYWORDS

Encapsulation, food for infant, fatty acids, alginate, enzymes

ŠMÍDOVÁ, Veronika. *Izolace a charakterizace přírodních aktivních látek a možnosti jejich aplikace při přípravě doplňků stravy* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123826>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Matoušková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí diplomové práce Ing. Petře Matouškové, PhD. za její odborné vedení, ochotu kdykoliv poradit a také za trpělivost. Dále bych ráda poděkovala mé konzultantce Ing. Julii Hoové za její cenné rady a pomoc při řešení dané problematiky. Také děkuji mamince, mému příteli Standovi a všem kamarádům za bezmeznou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Trávicí systém.....	2
2.2	Odlišnost dětského GIT od dospělého	2
2.3	Nezbytné živiny	3
2.3.1	Lipidy	3
2.3.2	Bílkoviny.....	6
2.3.3	Sacharidy.....	6
2.3.4	Vitaminy	6
2.3.5	Probiotika, probiotika a synbiotika	7
2.3.6	Ostatní živiny	7
2.4	Mateřské mléko a kojení.....	7
2.4.1	Složení mateřského mléka	7
2.5	Enzymy	8
2.5.1	Podstata enzymů v jednotlivých částech GIT	9
2.6	Onemocnění GIT u dětí	10
2.7	Enkapsulace	10
2.7.1	Alginát a enzymy	10
2.7.2	Metody enkapsulace.....	11
2.8	Doplňky stravy pro děti a jejich dostupnost	12
2.8.1	Doplňky stravy s ω -3 mastnými kyselinami.....	12
2.8.2	Enzymatické doplňky stravy.....	13
2.9	Působení aktivních látek v souvislosti s nádorovými onemocněními	13
2.9.1	Vliv mastných kyselin.....	13
2.9.2	Vliv karotenoidů	14
2.9.3	Vliv chlorofylu.....	14
2.9.4	Vliv flavonoidů	14
3	CÍLE PRÁCE	15
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
4.1	Použité chemikálie.....	16
4.2	Použité přístroje	16
4.3	Použitá semínka	17
4.4	Použitá buněčná kultura.....	17
4.5	Získ olejů	17
4.5.1	Lisování olejů za studena na lisu Yoda.....	18
4.5.2	Extrakce olejů pomocí automatického přístroje Soxtherm	18
4.6	Určení profilu mastných kyselin.....	19
4.7	Charakterizace extraktů	20
4.7.1	Analyzované vzorky	20
4.7.2	Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin.....	21
4.7.3	Stanovení celkových flavonoidů.....	21
4.7.4	Stanovení antioxidační aktivity.....	22

4.7.5	Stanovení obsahu karotenoidů a chlorofylů.....	22
4.8	Příprava částic.....	22
4.8.1	Příprava částic pomocí enkapsulátoru	23
4.8.2	Příprava liposomových částic	23
4.9	Charakterizace liposomů	23
4.9.1	Stanovení velikosti částic.....	23
4.10	Modelové trávení	23
4.10.1	Složení modelové žaludeční šťávy	23
4.10.2	Složení modelové pankreatické šťávy	23
4.10.3	Složení modelové žlučové šťávy	23
4.11	Stanovení koncentrace enzymů Hartree-Lowryho metodou	24
4.11.1	Složení použitých činidel.....	24
4.12	Stanovení proteolytické aktivity	24
4.13	Test cytotoxicity	25
4.13.1	Kultivace Caco-2 buněk.....	25
4.13.2	Příprava testovaných extraktů a kontrolních vzorků	25
4.13.3	MTT test cytotoxicity	25
4.14	Optimalizace složení navrhovaného doplňku stravy	25
4.15	Senzorická analýza	25
4.15.1	Pracovní pomůcky	26
4.15.2	Senzorické hodnocení	26
4.15.3	Analyzované vzorky	26
4.15.4	Metody použité pro senzorické hodnocení	27
5	Výsledky a diskuze	28
5.1	Příprava olejů z vybraných olejnatých semen	28
5.1.1	Lisování za studena pomocí kuchyňského lisu Yoda	28
5.1.2	Extrakce olejů pomocí přístroje Soxtherm	29
5.2	Určení profilu mastných kyselin.....	31
5.2.1	Profil mastných kyselin – pevné vzorky	32
5.2.2	Profil mastných kyselin u olejů.....	35
5.3	Charakterizace extraktů	37
5.3.1	Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin.....	37
5.3.2	Stanovení celkových flavonoidů.....	39
5.3.3	Stanovení antioxidační aktivity.....	40
5.3.4	Stanovení obsahu karotenoidů a chlorofylů.....	41
5.4	Příprava a charakterizace liposomů	43
5.4.1	Stanovení velikosti liposomových částic	43
5.5	Příprava alginátových částic a stanovení jejich stability v modelovém prostředí trávicího traktu.....	44
5.6	Stanovení proteolytické aktivity enkapsulovaných enzymů.....	45
5.7	MTT test cytotoxicity	46
5.8	Senzorická analýza	47
5.9	Návrh enzymatického doplňku stravy s optimálním složením.....	50

6	Závěr.....	52
7	Bibliografie.....	54
8	SEZNAM ZKRATEK.....	59
9	PŘÍLOHY	60

1 ÚVOD

Při správném vývoji v ranném dětském věku zcela nepochybně hraje markantní roli výživa a dostatečný přísun potřebných vitaminů a jiných aktivních látek. Stále častěji se stává, že je u dětí zjištěn deficit těchto látek a je potřeba je suplementovat. V mnoha případech se takto stává u těch dětí, které nejsou kojeny, a jejich strava je nahrazena umělou výživou. U nich je potřeba doplnit chybějící látky, které se v umělé výživě nemusí vyskytovat v dostatečném množství, ať už jsou to probiotické bakterie, vitaminy anebo právě mastné kyseliny, či enzymy. Zde přichází na scénu doplňky stravy, které pomohou doplnit potřebné chybějící látky a také pomohou předejít různým zdravotním komplikacím, které by se projevíly okamžitě nebo až v pozdějším věku. Také pomáhají při obtížích, jakými je například laktózová intolerance. Již v dnešní době je na trhu poměrně velké množství produktů, jež zastávají roli potravinových doplňků a jsou určeny pro děti.

Cílem diplomové práce je charakterizace různých bioaktivních látek. Práce se zaměřuje především na mastné kyseliny. Testovány byly vzorky lněného, sezamového, dýňového a kmínového oleje. Tyto oleje jsou již nyní oblíbenými dochucovadly v tradičních i exotických kuchyních. U těchto zvolených vzorků byl dále stanoven i celkový obsah fenolických sloučenin, chlorofyly a karotenoidy a antioxidační aktivita. Další část práce byla zaměřena na enzymy, především na vývoj atraktivního enzymového doplňku stravy. V předložené práci tak byla provedena enkapsulace enzymů do takové formy, aby se daly považovat za adekvátní doplněk stravy, který bude nejen svým vzhledem, ale i chutí imponovat cílové skupině, tedy dětem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Kvalitní strava pro dětskou populaci je velmi důležitá hlavně v prvních dvou letech života. V případě nedostatečné výživy hrozí dětem podvýživa, poruchy růstu, zvyšuje se riziko mentální retardace a zhoršuje se schopnost učení (1).

2.1 Trávicí systém

Orgány trávicího systému můžeme rozdělit do dvou skupin: trávicí trubice, která prochází tělem a nachází se v ní orgány jako dutina ústní, hltan, jícen, žaludek, tenké střevo a tlusté střevo. Trávicí trubici zakončuje řitní otvor. Druhou skupinou jsou přídatné trávicí orgány, tedy zuby a jazyk, žlučník, slinné žlázy. Také zde zahrnujeme dvě velké žlázy, tedy játra a slinivku (2).

Trávení je složitý proces, při němž je rozložena potrava a jsou z ní přes stěnu trávicí trubice resorbovány látky, které organismus využije jako zdroj energie, případně jako stavební látky. Zpracovaná potrava je nakonec vyměšována (3).

2.2 Odlišnost dětského GIT od dospělého

Gastrointestinální trakt (GIT) dětí se od toho dospělého liší hned v několika věcech. První a nejvíce patrná odlišnost je chrup. Lidský chrup má dvě stádia. Prvním je chrup mléčný, tedy dočasný. Druhým stádiem je chrup stálý. Mléčný chrup tvoří 20 zubů, kdežto chrup stálý 32 zubů. Na rozdíl od chrupu stálého nemá chrup mléčný žádné třenové zuby. Celkově jsou mléčné zuby drobnější. Zuby mléčného chrupu se začínají prořezávat mezi 6.–24. měsícem věku a zhruba od 6. roku jsou nahrazovány zuby stálými (4).

Další typickou odlišností je velikost (délka) orgánů, vzhledem k anatomii dítěte. Například žaludek má u novorozence objem pouhých 7 ml, roste ale velmi rychle a každý měsíc zvětšuje svou kapacitu zhruba o 20–25 ml. Dítě ve 2 letech má fyziologickou kapacitu žaludku (tedy jeho objem) mezi 580–680 ml, ve 4 letech mezi 650–750 ml, zatímco objem žaludku dospělého jedince činí 1–2 litry (5).

V případě žaludeční šťávy je rozdíl hlavně v její kyselosti. U novorozenců je normální hodnota pH okolo 2,3–3,6 a hodnot dospělého dosahuje až ve věku jednoho roku (tedy pH 1,2–2,0). Vliv má hlavně na přítomný enzym – pepsin, jehož účinnost klesá na méně než 10 % při pH 3 a zajišťuje srážení mléka v žaludku. Tuto nižší účinnost ale kompenzuje enzym chymozin, jež sráží kasein, který se nachází v mateřském mléce (5).

Játra v případě novorozenců tvoří asi 5 % hmotnosti celého těla, což je zhruba o 2 % více než u dospělého člověka. Jaterní funkce se vyvíjejí až zhruba do deseti let věku dítěte (5).

V případě žlučových cest je odlišnost hlavně v jejich délce. Novorozenci mají vývod žlučníku delší než vlastní žlučovod, přičemž u dospělých jedinců je tomu právě opačně. Až do 3 let věku je délka žlučových cest velmi malá. Složky žluči se tvoří v jaterních buňkách už od třetího měsíce vývoje plodu. Dětská žluč obsahuje méně žlučových kyselin, solí i cholesterolu a má více vody a hleny, než je tomu v případě žluči dospělého člověka (5).

Slinivka břišní je u novorozenců velmi malá a její růst se dělí na dvě fáze – nejprve roste v prvních dvou letech života a poté až mezi 13.–15. rokem. Pankreatická šťáva začíná být produkována již v pátém měsíci plodu. Množství enzymů v pankreatické šťávě se mění

s věkem dítěte. Během prvního roku života velmi stoupá množství amylázy a enzymů trypsinového komplexu (5).

Tlusté střevo je osídleno bakteriemi ihned po narození dítěte, přičemž jejich složení se mění s přibývajícím věkem a složením stravy. Při kojení převládají bakterie mléčného kvašení, po přechodu na smíšenou stravu se stává osídlení bakteriemi smíšené (5).

2.3 Nezbytné živiny

Strava v dětském věku by se neměla brát na lehkou váhu, jelikož nevyvážené a nevhodné složení může zapříčinit řadu civilizačních či chronických onemocnění, které se mohou vyvinout již v průběhu dětství nebo s postupem času v dospělosti (6).

2.3.1 Lipidy

Tuky jsou významným zdrojem i zásobárnou energie, jsou nezbytné pro vstřebávání vitaminů rozpustných v tucích a karotenoidů. Tvoří fosfolipidovou dvojvrstvu, což znamená, že jsou nezbytnou součástí biomembrán, slouží jako mechanická i termická ochrana (3), (7).

V potravě přijímáme tuky jako triacylglyceroly, kdy složení mastných kyselin, tedy jednotlivých řetězců je obvykle různé (3).

Mastné kyseliny dělíme na nenasycené (jedna nebo více dvojných vazeb) a nasycené mastné kyseliny (bez dvojných vazeb). Fyzikálně-chemické vlastnosti tedy závisí na tom, zda je mastná kyselina nasycená nebo nenasycená, jak dlouhý má řetězec a jestli je v *cis* nebo *trans* konformaci (3). Většina nenasycených mastných kyselin je v konformaci *cis*, nicméně v mase, mléce i v průmyslově ztužených tucích můžeme najít i *trans* formu, která je mnohem škodlivější než nasycené mastné kyseliny. Zvyšují hladinu celkového i LDL-cholesterolu, přičemž zároveň snižují hladinu HDL-cholesterolu. Podporují vznik diabetu druhého typu tím, že negativně působí na metabolismus glukózy a inzulinu. Pro vyvážený jídelníček a využití nejlepších účinků mastných kyselin, by se tedy mělo přibližně dodržovat doporučené zastoupení tuků a jednotlivých mastných kyselin ve stravě podle Světové zdravotnické organizace, viz Tabulka 1 (8).

Tabulka 1: Doporučované zastoupení tuků a jednotlivých mastných kyselin ve stravě podle Světové zdravotnické organizace (8)

	Typ mastných kyselin	Podíl na celkovém denním příjmu energie (%)
Celkový tuk		15–30 (pro malé děti až 45)
z toho	SFA	< 10
	PUFA	6–11
	v tom ω -6 PUFA	5–8
	v tom ω -3 PUFA	1–2
	TFA	< 1
	MUFA	dopočet

Nasycené mastné kyseliny jsou hlavně z živočišných produktů a jsou tuhé. Najít je můžeme ale i v produktech rostlinných, například v kokosovém a palmovém oleji. Při zvýšené konzumaci potravin, které obsahují velké množství nasycených mastných kyselin je zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění, jelikož mají bohatý obsah cholesterolu (3).

Nenasycené mastné kyseliny jsou obsaženy hlavně v rostlinných tucích (kromě palmového a kokosového) a v rybím tuku. Množství dvojných vazeb ovlivňuje jejich vlastnosti. Na mononenasycené mastné kyseliny jsou bohatá například lněná semínka, ořechy, avokádo atd. Strava s dostatečným množstvím těchto kyselin působí antiateroskleroticky, tedy proti vzniku aterosklerotického onemocnění, což je poškození cévních stěn, které vzniká ukládáním tuku do stěn cév, a to má za příčinu jejich zúžení a ztížení prokrvování orgánů. Polynenasycené mastné kyseliny obsahují 2–6 dvojných vazeb a můžeme je přijímat z rybího oleje, dýňových a sezamových semínek, vlašských ořechů a z většiny rostlinných olejů (3), (9). Jsou prospěšné z mnoha důvodů, jedná se zejména o prevenci nemocí srdce a cév. Redukují shlukování trombocytů, zabráňují vzniku krevních sraženin, tedy i vzniku trombózy. Zlepšují pružnost cévních stěn, snižují krevní tlak a hladinu cholesterolu (8).

V poslední době je kladen důraz zejména na význam PUFA ω -3, tedy ω -3 polynenasycené mastné kyseliny. Jsou podstatné pro správný vývoj dítěte, především v případě centrální nervové soustavy a imunitního systému, zlepšují krevní reologické vlastnosti. Mezi zástupce patří například DHA (kyselina dokosaheptaenová) a EPA (kyselina eikosapentaenová). DHA je velmi důležitá také pro tvorbu fosfolipidů a má velký protizánětlivý účinek. Užívání koncentráту PUFA ω -3 nebo rybího oleje vede z dlouhodobého hlediska ke zlepšení imunitního systému (10).

Existuje také přímá souvislost mezi ADHD onemocněním a nízkou hladinou PUFA ω -3 (DHA, EPA, kyselina arachidonová). Mozek savců je velice bohatý na ω -3 a ω -6 polynenasycené mastné kyseliny, hlavně DHA a kyselinu arachidonovou. Jelikož si lidské tělo není schopné tyto kyseliny syntetizovat, ale musí je přijímat v potravě, dochází k ovlivnění množství mastných kyselin v mozku vlivem nedostatečného příjmu těchto kyselin v potravě. Při podávání rybího oleje s vysokým obsahem DHA dětem s touto poruchou bylo prokázáno zmírnění jejich obtíží (11), (12).

Mastné kyseliny také ovlivňují expresi některých genů a jsou významné v metabolismu lipidů a sacharidů (3).

Malé množství lipidů se štěpí již v ústech a žaludku lipázami, zbytek se štěpí až v tenkém střevě, kde jsou tuky nejprve emulgovány žlučovými šťávami na drobné kapičky, čímž se zvětší povrch, na který může působit pankreatická lipáza a odštěpovat od glycerolu jednotlivé mastné kyseliny, které se přeměňují na micely, poté na lipoproteinové komplexy a pokračují do jater (3).

V případě poruchy digesce lipidů hrozí například cystická fibróza, jejíž příčinou je porucha pankreatické sekrece (7).

2.3.1.1 Oleje v potravinářství

Právě lněný olej se běžně využívá jako potravinový doplněk, díky vysokému množství ω -3 mastných kyselin. Získává se hlavně lisováním za studena, aby nedošlo k degradaci samotného oleje. Obsahuje hlavně kyselinu α -linolenovou, jejíž účinky jsou vhodné při zánětech, jako prevence kardiovaskulárních onemocnění a v neposlední řadě je důležitá pro správný vývoj už od dětského věku. Typicky lněný olej obsahuje zhruba 50 % kyseliny linolenové, zbytek tvoří kyselina linolová, olejová, arachidonová atd., viz Tabulka 2 (13), (14), (15).

Tabulka 2: Obvyklý obsah některých mastných kyselin ve lněném oleji (14)

Název mastné kyseliny	Obsah mastných kyselin [%]
α -linolenová	50–55
olejová	15–20
palmitová	5–6
stearová	4–5

Sezamový olej se běžně používá při přípravě různých pokrmů. Složení mastných kyselin je také bohaté, viz Tabulka 3. Má významné antioxidační účinky a je bohatým zdrojem vitamínu E (16).

Tabulka 3: Obvyklý obsah některých mastných kyselin v sezamovém oleji (17)

Název mastné kyseliny	Obsah mastných kyselin [%]
olejová	35–50
linolová	35–50
palmitová	7–12
stearová	3,5–5

Dýňový olej má díky své výborné chuti široké využití v potravinářství, ať už je to dochucování zeleninových salátů, příprava pest nebo sladkých dezertů. Bohaté využití nachází také v kosmetice, kde je doporučován například proti padání vlasů (18).

Stejně jako předešlé zmíněné oleje nachází také kmínový olej bohaté uplatnění v potravinářství, zvláště pro jeho exotickou vůni a chuť (19).

2.3.1.2 Získ olejů v potravinářství

Oleje můžeme získávat různými způsoby. Prvním způsobem je lisování zastudena. K samotnému lisování zde dochází za pomoci tlaku a za teploty maximálně 40 °C. Získaný olej je následně filtrován a poté zbaven vody, není potřeba jej rafinovat. Díky tomu je tato metoda asi nejšetrnější, zachovává se účinek olejů a jeho jednotlivých složek a chuť je výraznější. Naopak trvanlivost takto získaných olejů bývá nižší (20), (21).

Druhým způsobem získávání olejů je extrakce za přítomnosti organického rozpouštědla, většinou hexanu. Po extrakci je potřeba tyto oleje rafinovat (20), (21).

Oleje je také možné získat tradiční metodou, při které se semena očistí, oloupou a rozdrtí. Poté jsou spařeny vodní párou, čímž se semena otevrou a olej se z nich vylisuje. I zde je nutná rafinace (22), (21).

2.3.2 Bílkoviny

Bílkoviny jsou tvořeny aminokyselinami. Jsou základem všech enzymů, řady hormonů, kolagenu a dalších nezbytně důležitých látek (3).

Zdroje bílkovin jsou různé. Můžeme je přijímat ze živočišných produktů (vejce, maso, mléko), ale i z produktů rostlinných (hrách, čočka, sója, ořechy, rýže atd.) (3).

Bílkoviny jsou štěpeny proteolytickými enzymy na polypeptidy a ty jsou dále štěpeny na jednotlivé aminokyseliny. Nepatrná část (2–5 %) bílkovin není strávena a je rozkládána střevními bakteriemi v tlustém střevě (3).

Trávení bílkovin začíná až v žaludku pomocí pepsinu, jehož účinek zvyšuje kyselina chlorovodíková. Dlouhé řetězce aminokyselin se štěpí na kratší polypeptidy. Trávení pokračuje v tenkém střevě, kde pankreatické enzymy (trypsin, chymotrypsin, karboxypeptidázy a elastáza) štěpí bílkoviny na oligopeptidy, které jsou dále štěpeny na jednotlivé aminokyseliny díky peptidázám a aminopeptidázám (3).

2.3.3 Sacharidy

Sacharidy přijímáme hlavně ve formě glukózy v obilovinách, ovoci, zelenině, ale také v mléku a mléčných výrobcích, kde je obsažen sacharid laktóza, která u zdravých lidí pozitivně ovlivňuje střevní mikroflóru. Sacharidy slouží jako hlavní zdroj energie a jako zásobní látky ve formě glykogenu (3).

Relativně velké procento populace (15 %) trpí nedostatkem enzymu laktázy. To je příčinou zažívacích potíží při příjmu mléčných výrobků. Nedostatek tohoto enzymu se začíná projevovat mezi 4.–16. rokem života (3).

Trávení sacharidů začíná v ústech pomocí enzymu amylázy na jednodušší sacharidy. V žaludku je působení tohoto enzymu inaktivováno, štěpí se zde tedy pouhý zlomek sacharidů. Většina sacharidů se štěpí v tenkém střevě pankreatickou a střevní šťávou hlavně na glukózu (3).

2.3.4 Vitaminy

Vitaminy jsou také nezbytnou součástí naší výživy, protože většinu z nich neumíme syntetizovat. Jsou součástí různých enzymů, jsou to významné antioxidanty a biokatalyzátory chemických reakcí. Jediné vitaminy, které syntetizovat umíme je vitamin D a malé množství B3 z aminokyseliny tryptofanu a také vitamin K v tlustém střevě (3).

V případě nedostatku vitaminů se může projevit hypovitaminóza, případně avitaminóza (3).

Vitaminy dělíme na rozpustné v tucích (A, D, E, K), které se v těle hromadí a jejich nedostatek se projevuje až po delší době a rozpustné ve vodě (C, B-komplex), které se v těle nehromadí, protože jsou okamžitě využívány (3).

Vitaminy rozpustné v tucích ke svému vstřebávání potřebují ve střevě přítomnost pankreatických enzymů a žlučových kyselin. Lidský organismus si je schopen vytvářet zásoby těchto vitaminů, proto je nutné si příjem těchto vitaminů v podobě doplňků stravy hlídat, aby nedošlo k předávkování (23).

Kojenci mají zvýšenou potřebu vitaminu A, C a D. Děti a dorost mají zvýšenou potřebu vitaminů A, B, C a D (3).

U nedonošených dětí se může projevit nedostatek některých vitaminů, proto je potřeba je suplementovat různými multivitaminovými preparáty, ať už ve formě umělého mléka nebo jiných speciálních přípravků (23).

2.3.5 Probiotika, probiotika a synbiotika

Naše tlusté střevo je osídleno bakteriemi. K tomuto osídlení dochází krátce po narození dítěte, čímž se významně podílí na fungování imunitního systému. Probiotika jsou živé bakterie, jež mají za úkol zprostředkovat vhodné prostředí ve střevě pro komplexní střevní mikroflóru. Důležité jsou často po užívání antibiotik, kdy je mikroflóra antibiotiky velmi poškozena. Pomáhají trávit laktózu a zvyšují vstřebávání vápníku (3).

Prebiotikum je nestravitelná složka potravy, která slouží jako „potrava“ pro probiotické bakterie. Často se jedná o oligosacharidy, či polysacharidy (3).

Synbiotikem poté nazýváme produkt, která obsahuje prebiotika i probiotika současně (3).

2.3.6 Ostatní živiny

Neméně důležitými látkami, které se vstřebávají zejména sliznicí tenkého střeva, jsou například sodík, draslík, vápník a železo. Obecně se jedná o minerální látky a stopové prvky (síra, železo, zinek, jód, selen, mangan atd.) (3).

Podstatné jsou také takzvané fytochemikálie. Jde o látky, které obsahují rostliny a zajišťují jejich klíčení, ochranu proti škůdcům, UV záření a také jejich pigmentaci. Patří mezi ně fenolické sloučeniny, flavonoidy, alkaloidy a nespočet dalších látek. Mají protizánětlivé, protinádorové i antimikrobiální účinky. Také snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění (3).

2.4 Mateřské mléko a kojení

Mateřské mléko obsahuje vše potřebné pro zdravý růst a vývoj dítěte. Je prokázáno, že u dětí, které byly kojeny je významně nižší riziko chronických a akutních onemocnění, jakožto i snižuje frekvenci výskytu a intenzitu průběhu alergických onemocnění, cukrovky, Crohnovy choroby atd. Kojení ale není významné jen pro děti, ale také pro matky. Z výzkumů vychází, že u žen, které kojí je nižší riziko vzniku karcinomu prsu v pozdějších letech, stejně jako se urychluje poporodní hojení (1).

2.4.1 Složení mateřského mléka

Složení mateřského mléka se mění v průběhu prvních dnů a adaptuje se na nároky novorozence (1).

Na konci těhotenství a krátce po porodu se tvoří takzvané kolostrum, které obsahuje velké množství bílkovin, málo cukrů a tuků (1).

Složení mléka se začíná měnit mezi 3.–5. dnem kojení, kdy se jedná o tzv. přechodné mléko a někdy mezi 10.–14. dnem kojení z něj vzniká mléko zralé. To obsahuje zhruba 90 % vody a zbytek tvoří bílkoviny, nebiřkovinné dusíkaté látky, tuky, vitaminy rozpustné ve vodě a v tucích, cukry, stopové prvky, minerální látky a buněčné elementy (1).

Sacharidy

Mateřské mléko obsahuje až 7 % laktózy, která je štěpená enzymem laktázou na glukózu a galaktózu. Toto množství je dvojnásobné oproti například kravskému mléku, proto je sladší (3).

Sacharidy v mateřském mléce také tvoří substrát pro živé bakterie, mezi nimiž jsou například *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* a další (24).

Tuky

Tuky tvoří 40–50 % kalorií v mateřském mléce. Většinu představují triglyceridy, fosfolipidy, cholesterol a volné mastné kyseliny. Tuky mají velký význam pro růst a vývoj dítěte, jelikož tvoří součást buněčných membrán, zajišťují vstřebávání vitaminů rozpustných v tucích a obsahují esenciální mastné kyseliny. Z těch je asi 42 % nasycených. Tuk v mateřském mléce je asi z 90 % tvořen triglyceridy, které jsou štěpeny pankreatickou lipázou na mastné kyseliny a glycerol. Tyto mastné kyseliny se dostávají přímo do jater, není potřeba jejich opětovné štěpení lipázou. Z tohoto důvodu se využívají ve výživě nedonošených dětí a při poruše trávení tuků (1).

Až 57 % mastných kyselin je nenasycených. Ty jsou nepostradatelné například pro růst a vývoj centrální nervové soustavy, metabolismus cholesterolu a jako regulátory metabolických interakcí zánětů (1).

Poměr ω -3 a ω -6 mastných kyselin je důležitý v prevenci proti rozvoji alergickým onemocněním (24).

Mateřské mléko obsahuje vysoké množství cholesterolu, který je také nezbytný pro vývoj centrální nervové soustavy, a také je výchozí látkou pro tvorbu některých hormonů (1).

Enzymy

Mateřské mléko obsahuje také enzymy. Typickým příkladem je enzym lipáza, který nahrazuje lipázu pankreatickou a je nezbytný pro štěpení tuků, které dítě v mateřském mléce přijme (1).

Vitaminy

Za předpokladu, že se dostává kojící matce správně složené stravy, obsahuje mateřské mléko dostatečné množství vitaminů, potřebných pro správný vývoj dítěte (1).

2.5 Enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly, biochemické katalyzátory, které zajišťují správný chod biochemických reakcí. Jsou značně specifické a k jejich funkci jsou většinou nutné mírné podmínky, tzn. teplota 20–40 °C a pH kolem 7. Jejich účinky jsou snadno regulovatelné, mnohdy na více úrovních (25).

Máme několik tříd enzymů, jsou to oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, izomerázy, ligázy a lyázy (25).

Například pepsin spadá do třídy hydroláz. Jedná se o proteázu štěpící peptidové vazby (25).

2.5.1 Podstata enzymů v jednotlivých částech GIT

Již v dutině ústní, kde zpracování potravy začíná zejména mechanicky, ale i chemicky, se nachází důležité enzymy. Sliny obsahují enzym amylázu, který zajišťuje štěpení živin, jež jsou obsažené v potravě. Žlázy jazyka v malém množství produkují enzym lipázu, která štěpí triacylglyceroly na mastné kyseliny a diacylglyceroly (3).

Žaludek produkuje žaludeční šťávu, která je složena z vody, kyseliny chlorovodíkové, mucinu, pepsinogenu, chymozinu a karboxypeptidázy. V žaludku probíhá zejména štěpení bílkovin, tuky a sacharidy se štěpí minimálně. Kyselina chlorovodíková je zde významnou složkou, jelikož vytváří vhodné prostředí pro působení pepsinu a rovněž chrání některé vitaminy v potravě před znehodnocením, například vitamin C, B1 a B2. Také napomáhá vstřebávání vápníku a železa (3).

Hlavním úkolem tenkého střeva je vstřebávání živin, které jsou již rozštěpeny účinkem enzymů. Bílkoviny na aminokyseliny, sacharidy na jednoduché cukry a tuky na mastné kyseliny a glycerol. V první části tenkého střeva (dvanáctníku) se trávenina mísí se střevní a pankreatickou šťávou a se žlučí. Dochází k produkci hormonů sekretinu a pankreozyminu, které jsou přeneseny do pankreatu, kde začne produkce pankreatické šťávy, která obsahuje enzymy podstatné pro trávení všech živin. V tenkém střevě dochází k produkci střevní šťávy, která obsahuje vodu, peptidázy (zajišťují štěpení peptidů na aminokyseliny), nukleázy (štěpí nukleové kyseliny na pentózu, purinové báze a fosfát), sacharázy (štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu), lipázy (štěpí triacylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol), enteropeptidázy (aktivují trypsinogen na trypsin) a mucin (3).

První velkou žlázou trávicího traktu je slinivka břišní neboli pankreas. Jedná se o největší sekreční žlázu lidského těla. Má exokrinní funkci, což znamená, že produkuje velmi silné trávicí enzymy, například trypsin a chymotrypsin. Produkuje ale i hormony inzulin a glukagon, které jsou nezbytně důležité pro život, tudíž její funkce je i endokrinní. Pankreas produkuje pankreatickou šťávu, která se skládá z trypsinogenu, karboxypeptidázy, chymotrypsinogenu, ribonukleázy, amylázy, lipázy, fosfolipázy a bikarbonátů, které neutralizují kyselý žaludeční obsah. Produkuje také enzym cholesterolesterázu, který zajišťuje přeměnu cholesterolu na větší sloučeninu pomocí mastných kyselin a tím výrazně snižuje jeho prostupnost do krve přes střevní stěnu (3).

Druhou a zároveň největší žlázou lidského těla jsou játra. Jaterní buňky přicházejí jako první do styku s látkami, které přijímáme z potravy. Odpadní metabolity začleňují do žluče, která následně odchází do žlučníku. Žluč se skládá z vody, žlučových kyselin a jejich solí, žlučových barviv (bilirubin) a cholesterolu (3).

V tlustém střevě dochází především k absorpci vody a solí. Zahušťuje se střevní obsah. Velmi důležitou částí je střevní mikroflóra, která zajišťuje kvasné reakce u cukrů a hnilobné pochody u aminokyselin a bílkovin. Tato mikroflóra, resp. její složení, je většinou konstantní, pokud nedojde k výrazné změně stravovacích návyků. Takové situaci se složení střevní mikroflóry přizpůsobí, ale změna se může projevit například poruchou vylučování (3).

2.6 Onemocnění GIT u dětí

Onemocnění gastrointestinálního traktu je po respiračních onemocněních druhými nejčastějšími chorobami u dětí (26).

Mnoho dětí ve věku od 1 do 3 let má v Evropě, včetně České republiky, nedostatek ω -3 mastných kyselin, vitamínu D, železa a jódu. Je to většinou z důvodů nepravidelné stravy, nevhodným výběrem potravin a tím pádem nedostatečným přísunem těchto nezbytně důležitých látek (27).

Při nedostatečné činnosti slinivky břišní, a tedy nedostatku trávicích enzymů je nutné podávat pankreatické enzymy, nejčastěji ve formě kapslí, které obsahují mikročástice, v nichž jsou obsaženy tyto enzymy, konkrétně lipáza, amyláza a peptidázy. Nejčastěji je tato suplementace enzymů nutná při chronické pankreatitidě, kdy dochází k fibrózní přestavbě žlázy, nádorech pankreatu nebo při onemocnění cystickou fibrózou, kterou doprovází ztráta pankreatického parenchymu. Dále při diabetu, Crohnově nemoci, případě i celiakii (28).

Enzymy musí být podávány v dostatečném množství a vždy během jídla, aby se potřebné terapeutické množství dostalo do místa určení. Příklad dávkování je vyobrazen v Tabulka 4. Pankreatické proteázy jsou funkční nejdále v lačniku, což je střední oblast tenkého střeva. Amyláza je funkční nejdále v kyčelníku, tedy v konečné oblasti tenkého střeva. Lipáza je velmi citlivá na pH, proto její aktivita končí mezi dvanáctníkem a lačníkem (28).

Při terapeutickém podávání pankreatických enzymů je potrava lépe trávena a je pozitivně ovlivněna absorpce tuků (28).

Tabulka 4: Příklad terapie nedostatku pankreatických enzymů (28)

Obsah lipázy v jednotkách	
Snídaně	25 000–40 000
1. svačina	10 000–20 000
Oběd	25 000–40 000
2. svačina	10 000–25 000
Večeře	25 000–40 000
2. večeře	10 000–20 000
J. E. Dominiguez-Munoz, et al. 2011; N. Cohen et al. 2010	

2.7 Enkapsulace

Enkapsulace je metoda, při níž vznikají částice o průměru několika nanometrů až milimetrů, přičemž v těchto částicích je enkapsulovaná nejčastěji nějaká imobilizovaná aktivní látka. Tyto částice (tzv. nosiče) jsou tvořeny z částečně propustné membrány a musejí být biologicky odbouratelné. Tato membrána zamezuje úniku aktivní látky do vnějšího prostředí a umožňuje tak dopravit látku na předem určené místo. Často se tedy používají jako nosiče léčiv pro řízené uvolňování (29).

2.7.1 Alginát a enzymy

Enkapsulace enzymů do alginátových částic slouží pro cílené a dlouhodobé uvolňování v místě určení. Alginát je biodegradabilní kopolymer kyseliny manuronové a guluronové,

který je finančně nenáročný a netoxický. Mimo jiné je hydrofilní a tvoří 3D síťované struktury, která ochraňuje enkapsulované látky před kyselým prostředím žaludečních šťáv, kvůli čemuž má dobrý potenciál konkurovat komerčním nosičům pankreatinu (30).

2.7.2 Metody enkapsulace

Dnes již existuje velké množství enkapsulačních technik, ze kterých je možné si vybrat tu nejideálnější pro danou aktivní látku, kterou chceme enkapsulovat. Rozhodovat bychom se měli hlavně podle vlastností dané aktivní látky, ale také podle konečného použití produktu.

2.7.2.1 Lyofilizace

Lyofilizace je sprejové sušení, které se používá pro dehydrataci vzorků. Metoda je sice jednoduchá, ale poměrně časově náročná, sušení trvá zhruba 20 hodin. Většinou se využívá pro enkapsulaci ve vodě rozpustných látek, včetně aromatických látek a léčiv. Díky své povaze se používá pro enkapsulaci léčiv citlivých na vysoké teploty (31).

2.7.2.2 Extruze

Při extruzi probíhá dispergace jádra v tekutině, která následně tvoří obal jádra. Tato směs je poté po dávkách odkapávána do vytvrzovacího roztoku, ve kterém dochází ke gelaci nebo tuhnutí. K vytvrzení se používá izopropylalkohol. Pomocí tohoto typu enkapsulace lze připravit částice spíše větších rozměrů, které mohou být použity k enkapsulaci různých příchutí (32), (33).

2.7.2.3 Sprejové sušení

Sprejové sušení je nejpoužívanější technikou enkapsulace v potravinářském průmyslu. Oblíbené je hlavně kvůli své finanční a technické dostupnosti. Jedná se o dehydratační proces, jehož principem je homogenizace potřebné látky v nosiči (nejčastěji vodný roztok, výjimečně organické rozpouštědlo), v typickém poměru nosič-látka 4 : 1. Tato směs je poté atomizována a následně sprejována do prostoru sušárny při teplotě 150–220 °C. Tato vysoká teplota je důvodem, proč tato technika není vhodná pro tepelně labilní látky, jako jsou například enzymy. Enkapsulované částice jsou po skončení odděleny v separačním cyklonu (34), (32).

Příkladem využití je příprava sušeného mléka. Nevýhodou této techniky je, že materiály, které jsou použité při enkapsulaci musí být rozpustné ve vodě (32).

2.7.2.4 Sprejové chlazení

Při sprejovém chlazení je enkapsulovaná látka dispergována v horkém roztaveném obalovém materiálu a následně atomizována. Nosičem jsou často různé oleje nebo vosky. Díky tomuto se dá k různým enkapsulovaným látkám volit různý obalový materiál v závislosti na potřebném bodu tání (32).

Tato technika se nejčastěji používá k enkapsulaci vitaminů, minerálů, případně různých okyselovacích přípravků (32).

2.7.2.5 Odpaření/extrakce rozpouštědla

V tomto případě enkapsulace záleží, jaké povahy máme vnější fázi (vodnou, nevodnou), jak budeme účinnou látku dispergovat ve vnější fázi a jakým způsobem proběhne odstranění rozpouštědla (odpaření, extrakce) (33).

Jako obalový materiál se většinou používá polymer, který je rozpuštěn v organickém rozpouštědle. V tomto médiu je dispergována aktivní látka za tvorby roztoku, suspenze nebo

emulze. Pro stabilizaci se využívají emulgátory. Organické rozpouštědlo je poté odpařeno a vznikají mikročástice, jež můžeme získat filtrací, případně odstředěním. Tyto částice je potřeba ještě vysušit lyofilizací nebo za sníženého tlaku (33).

Takto připravené částice se mohou využívat pro zpracování steroidních hormonů, cytostatik, neuroleptik nebo antimalarik (33).

2.7.2.6 Fázová separace (koacervace)

Při této metodě dochází k rozdělení polymerního roztoku na dvě nemísitelné kapalně fáze. První fází (koacervační) je makromolekulární látka. Druhou fází je koacervační médium (supernatant), která je oproti koacervační fázi zředěná (33).

Koacervace se využívá primárně pro přípravu mikrotobolek, jež se využívají například s kyselinou acetylsalicylovou, jakožto známý Aspirin, ale i pro jiná léčiva. Takto připravené mikrotobolky jsou určeny především pro perorální podání a jejich výhodou je prodloužené uvolňování aktivní látky v gastrointestinálním traktu až po dobu 8 hodin.

Jako polymerní obalový materiál se může použít například ethylcelulosa, ale také alginát, chitosan, případně karagenany, polyfosfáty atd (33).

Kromě využití ve farmacii je koacervace oblíbenou enkapsulační technikou v potravinářském průmyslu (konzervanty, sladidla, barviva) a v zemědělském průmyslu (obalování semen) (33).

2.7.2.7 Obalování ve fluidní vrstvě

Podstatou tohoto typu enkapsulace je obalování jader kapkami obalové fluidní vrstvy za vysokého tlaku a definované rychlosti. Kapky se z jader odpařují a krystalizují na nich rozpuštěné látky (33).

Tato metoda se využívá hlavně pro enkapsulaci sférických částic o velikosti 30–2000 μm a její velkou výhodou je vysoká výtěžnost a stejnoměrná tloušťka obalové vrstvičky, z těchto důvodů se využívá ve farmaceutickém průmyslu při výrobě léků (33).

2.8 Doplnky stravy pro děti a jejich dostupnost

2.8.1 Doplnky stravy s ω -3 mastnými kyselinami

Existuje široké množství různých typů doplňků stravy, které obsahují ω -3 mastné kyseliny a jsou určené pro děti. Tyto doplňky stravy jsou omezeny věkem a možnost jejich užívání začíná většinou od 3. roku dítěte. Udává se, že adekvátní příjem ω -3 mastných kyselin pro děti by měl být víceméně v souladu s doporučeními pro dospělé, tedy 250 mg/den EPA a DHA (27).

Na trhu najdeme pastilky, tobolky, sirupy, tabletky, gely a další typy těchto produktů. Výrobky obsahují různá množství ω -3 mastných kyselin, z toho většinou kyselinu eikosapentaenovou (EPA) a kyselinu dokosaheptaenovou (DHA). Informace o použití a složení výrobků jsou uváděny vždy v příbalovém letáku přípravku, případně na jeho obalu.

Součástí těchto typů doplňků stravy jsou často i jiné, zdraví prospěšné látky, například různé vitaminy (A, C, D, E).

Aby výrobci zamaskovali nepříjemnou chuť rybího oleje, která obzvláště pro dětskou populaci může být nepříjemná, používají různá sladidla, či jiné příchutě. K zakoupení jsou

tedy s příchutí citronovou, banánovou či lesního ovoce a další. Pro zvýšení atraktivity lze nalézt i produkty, podobající se cukrovinkám, například ve tvaru gumových medvídků.

2.8.2 Enzymatické doplňky stravy

I přípravků obsahující různé druhy enzymů nalezneme mnoho. Užívají se pro podporu trávení, ale také při různých onemocněních, kdy člověk musí enzymy konzumovat společně s jídlem, aby byl schopen potravu kvalitně strávit. Nejčastěji jsou to onemocnění slinivky břišní nebo žaludku, případně při problémech s tlustým nebo tenkým střevem (35).

Tyto doplňky se také mohou přijímat v případě potravinové intolerance, jako je tomu nejčastěji u laktózy. K rozložení laktózy je potřeba enzym laktáza, který v případě laktózové intolerance chybí nebo je ho nedostatek (35).

Takovéto enzymatické doplňky stravy nejčastěji obsahují pankreatin živočišného původu, do popředí se ale dostávají i doplňky s enzymy získanými z přírodních zdrojů, například bromelain získaný z ananasu nebo papain získaný z papáji (35).

Pankreatin je směs enzymů složená z amylázy, lipázy a proteázy a bývá ve formě kapslí, tablet nebo obyčejného prášku. Přijímat by se měl (při onemocněních) s každým jídlem, tedy minimálně třikrát denně (36), (30).

2.9 Působení aktivních látek v souvislosti s nádorovými onemocněními

Rakovina tlustého střeva je jedním z nejčastějších onemocnění dnešního vyspělého světa s vysokou mortalitou. Stejně jako ostatní typy nádorových onemocnění se vyznačuje nekontrolovatelným buněčným dělením. Tyto buňky jsou poté schopny proliferovat či metastázovat do jiných částí těla, případně do různých orgánů. Vývoj rakoviny provází mutace supresorových proteinů, aktivace angiogeneze a antiapoptózy a v neposlední řadě inaktivace jednotlivých kontrolních bodů buněčného cyklu (37), (38).

K léčbě těchto nádorových onemocnění se nejčastěji využívají chemoterapeutika, radioterapie, případně dochází k chirurgickým zákrokům. Nicméně rozvíjí se snaha o vývoj léčiv s minimální toxicitou a minimálními vedlejšími účinky za využití různých bioaktivních látek. Mezi tyto látky patří různé fytochemikálie zahrnující například fenolické sloučeniny, flavonoidy nebo karotenoidy. I proto je důležité zahrnovat do výživy dostatečné množství rostlinné stravy, kvůli dostatečnému příjmu vitaminů, minerálů, vlákniny a již výše zmíněných fytochemikálií (38), (39).

Pravděpodobně nejznámějšími buněčnými liniemi, které se používají k různým *in vitro* testům jsou Caco-2 buňky, tedy buněčná střevní nádorová linie. Mohou být poměrně snadno kultivovány a slouží jako simulace střevních enterocytů (40).

2.9.1 Vliv mastných kyselin

U lidí, kteří konzumují velké množství rybího oleje je výskyt kolorektálních nádorových onemocnění násobně menší než u zbytku populace. Nespočet studií proto předpokládá, že polynenasycené mastné kyseliny mohou chránit před kolorektálními nádorovými onemocněními. Zatímco nasycené a mononenasycené mastné kyseliny se dovedou do membrány buněk inkorporovat poměrně obtížně, polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) do nich nemají problém proniknout (37).

PUFA jsou schopny inhibice proliferace buněk a výrazně ovlivňují jejich viabilitu, z čehož vyplývá, že jsou potenciálními inhibitory růstu celých linií nádorových buněk. V neposlední řadě mají příznivý efekt na fluiditu membrán a silně zvyšují peroxidaci lipidů nádorových buněk (37).

2.9.2 Vliv karotenoidů

Karotenoidy patří do skupiny lipofilních pigmentů. Kromě bakterií a řas se vyskytují také u vyšších rostlin. Jako příklad lze uvést rajčata, melouny, dýně nebo goji. Mezi karotenoidy se typicky řadí β -karoten, lykopen, případně xantofyly (41), (42).

Velké množství ovoce a zeleniny obsahuje volné i esterifikované karotenoidy, které působí jako výborná prevence proti různým onemocněním. Jelikož se jedná o antioxidanty, jsou tyto molekuly schopné vázat volné radikály a tím snižovat riziko vzniku nádorových a kardiovaskulárních onemocnění, a dokonce předchází i riziku mrtvice (42).

Karotenoidy nacházející se v ovoci a zelenině jsou také důležitými prekurzory vitamínu A, konkrétně β -karoten má ze všech karotenoidů nejvyšší podíl provitaminu A (43).

Oproti β -karotenu vykazuje α -karoten vyšší schopnost potlačit nádorové bujení kůže, plic, jater i tlustého střeva (43).

Lutein vyskytující se například v kapustě, špenátu, mangu, broskvích a pomerančích vykazuje také protirakovinné účinky, stejně jako lykopen, který se vyskytuje převážně v rajčatech a rajčatových produktech (43).

2.9.3 Vliv chlorofylu

Stejně jako je tomu v případě karotenoidů, má i chlorofyl výborné preventivní účinky hlavně proti rakovinotvornému bujení. Chlorofyly jsou nejrozšířenějšími pigmenty v přírodě a jsou významnými antioxidanty (44).

Chlorofyl je schopen tvořit cheláty s některými karcinogeny a mutageny, čímž snižuje právě riziko vzniku rakoviny (45).

Deriváty chlorofylu, které se díky své lipofilní povaze začleňují do micel, se také používají u některých zobrazovacích technik, primárně jde o zobrazování střev (45).

2.9.4 Vliv flavonoidů

Flavonoidy mají v rostlinách důležitou roli v pigmentaci, klíčení a v ochraně proti škůdcům a UV záření. Nacházejí se v ovoci, zelenině, v sóji i v čajích. Vykazují protinádorové, protizánětlivé, antivirální i antimikrobiální účinky, proto jsou důležité v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, vzniku nádorů i cukrovky. Inhibují také peroxidaci lipidů. Struktura flavonoidů má prokazatelně vliv na jejich antioxidační aktivitu. Například, čím více OH skupin flavonoidy obsahují, tím větší redukční schopnosti vykazují. Záleží ale také na poloze těchto skupin, pokud jsou navzájem v poloze *orto* nebo *meta*, je antioxidační aktivita flavonoidů nízká (46), (47).

Při podrobném zkoumání mechanismu účinku flavonoidů je zřejmé, že tyto látky inhibují množství enzymatických systémů (47).

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce je vývoj a charakterizace moderních doplňků stravy s obsahem vybraných aktivních látek pro dětskou výživu. V rámci práce budou řešeny tyto dílčí cíle:

- 1) Výběr, charakterizace a izolace přírodních aktivních látek
- 2) Enkapsulace zvolených aktivních látek a jejich směsí
- 3) Návrh optimálního složení dětských doplňků stravy s obsahem zvolených aktivních látek

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Methanol pro HPLC – Sigma (D)
Chloroform pro HPLC – Lach:Ner (ČR)
Ethanol pro UV/VIS, Lach:Ner (ČR)
Follin-Ciocalteu činidlo – p.a., Lach:Ner (ČR)
n-Hexan pro HPLC – VWR (USA)
ABTS, Sigma-Aldrich (D)
Chlorid hlinitý, Lach:Ner (ČR)
Dusitan sodný, Lach:Ner (ČR)
Hydroxid sodný, Lach:Ner (ČR)
Peroxodisíran draselný, Lach:Ner (ČR)
Uhlíčan sodný bezvodý, Lach:Ner (ČR)
Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (D)
Trolox, Sigma-Aldrich (D)
Katechin, Sigma-Aldrich (D)
Alginát sodný, Sigma-Aldrich (USA)
Aceton, LachNer (ČR)
Kyselina chlorovodíková 35 %, Lach:Ner (ČR)
Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát p.a., Vitrium-Lach:Ner (ČR)
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a., Vitrium-Lach:Ner (ČR)
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lach:Ner (ČR)
Pankreatin (vepřový pankreas), Sigma-Aldrich (D)
Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (Česká republika)
Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma-Aldrich (D)
Pepsin, Sigma-Aldrich (D)
MTT, Duchefa Biochemie (NLD)
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)
Antibiotic-antimycotic 100x (Biosera), Biotech (Německo)
Dodecylsírán sodný, Serva (DE)
FBS, HyClone (USA)
PBS solution 10X VWR (Česká republika)

4.2 Použité přístroje

Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)
Analytické váhy, Boeco (Německo)
Lis na olej YODA 02, YODA (ČR)
Soxhletův extraktor – Soxtherm, Gerhardt (Německo)
Plynový chromatograf TRACE GC/FID (ThermoFisher Scientific, USA)
Vakuová odparka RV 06, IKA (Německo)
Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (VB)
Automatické pipety v různém rozsahu objemů – Discovery (D), Biohit (Německo)
Vortex REax Top, Heidolph (Německo)

Enkapsulátor Büchi B-395 Pro (CH)
 DLS analyzátor Zetasizer Nano ZS, Malvern (UK)
 Mikrocentrifuga Mikro 120, Hettich Zentrifugen (Německo)
 Biohazard box, Airstream II, ESCO (Německo)
 CellCulture CO2 inkubátor, ESCO (Německo)
 ELISA reader EL800, BioTek (USA)
 Software Gen 5, BioTek (USA)
 Inverzní biologický mikroskop i-101 LW Scientific (USA)
 Kamera BioVID 1080P/2M, LW Scientific (USA)
 Software Toupview, ToupTek Photonics (Čína)

4.3 Použitá semínka

K získání extraktů byly použity čtyři druhy semínek, konkrétně dýňová, sezamová, lněná a semena římského kmínu. Dýňová, sezamová a lněná semínka byla zakoupena ve Zdravé výživě 3lístek v Brně a římský kmín v hypermarketu Tesco v Brně. Tyto zakoupené druhy jsou vyobrazené na Obrázek 1.



Obrázek 1: Zakoupené druhy semen pro získ olejnatých extraktů

4.4 Použitá buněčná kultura

K testování cytotoxicity byly použity Caco-2 střevní nádorové buňky ze sbírky buněčných kultur Cell Lines Services (Německo), které byly izolované z adenokarcinomu tlustého střeva.

4.5 Získ olejů

Ze všech čtyř zakoupených druhů semínek, tedy dýňových, sezamových, lněných i z římského kmínu byly oleje extrahovány dvojím způsobem. První způsob získu olejů byl pomocí lisu Yoda, podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.1. Dále byly oleje ze semen extrahovány hexanem pomocí automatického přístroje Soxtherm, podle postupu v kapitole 4.5.2. Postup získávání olejů je schematicky znázorněn na Obrázek 2.



Obrázek 2: Schematické znázornění průběhu zisku olejů

4.5.1 Lisování olejů za studena na lisu Yoda

Olej byl vylisován z naváženého množství semínek pomocí kuchyňského lisu Yoda (Obrázek 3) dle přístrojového manuálu. Po vylisování byly oleje uskladněny při teplotě 8 °C k dalšímu použití a měření. Zpracována byla také část pokrutiny. Určitá část byla odebrána, navážena a uložena k extrakci zbytkového množství olejů na automatickém přístroji Soxtherm.



Obrázek 3: Lis Yoda (1) a pokrutiny (2) z lisování sezamových semínek

4.5.2 Extrakce olejů pomocí automatického přístroje Soxtherm

Pomocí automatického přístroje Soxtherm byly extrakcí hexanem získány vzorky olejů (Obrázek 4). Software pro řízení extrakce na Soxthermu byl nastaven podle parametrů uvedených v Tabulka 5. Po dokončení extrakce bylo zbývající rozpouštědlo odpařeno na

vakuové odparce. Pro odpaření úplných zbytků rozpouštědla byly vzorky umístěny přes noc do exsikátoru. Po provedení extrakce byly oleje uskladněny při teplotě 8 °C k dalšímu použití a měření.



Obrázek 4: Ukázka extrakce na automatickém přístroji Soxtherm

Tabulka 5: Parametry pro extrakci olejnatých extraktů na automatickém přístroji Soxtherm

Parametr	Hodnota
T-classification	200 °C
Extraction temperature	170 °C
Reduction pulse	3 s
Reduction interval	3,5 min
Hot extraction	1,5 hod
Evaporation A	5x interval
Extraction time	1 hod
Evaporation B	2x interval
Evaporation C	10 min
Program lenght	3 hod 4 min

4.6 Určení profilu mastných kyselin

Obsah mastných kyselin byl stanoven v semínkách, ve vzorcích pokrutin a v lipidických extraktech.

Lyofilizované pokrutiny byly nejprve převedeny do kryptovrací vialky spolu s 1,8 ml transesterifikační směsí a derivatizována přeměnou na methylestery mastných kyselin při 85 °C po dobu 120 minut v termobloku. Poté byl celý obsah vialky převeden do větších 4 ml vialek a bylo připipetováno 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH a 1 ml hexanu. Takto připravená směs se asi 5 minut intenzivně protřepávala na multipozičním vortexu. Po oddělení fází bylo z horní hexanové fáze odebráno 0,1 ml vzorku do čisté vialky a bylo připipetováno 0,9 ml hexanu. Takto připravený vzorek byl bezbarvý a homogenní.

U lipidických extraktů bylo napipetováno vždy 1 ml vzorku, k němuž bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi. Poté byly extrakty derivatizovány za stejných podmínek jako vzorky pokrutin. Po transesterifikaci a vychladnutí krymplovacích zkumavek byl celý jejich obsah převeden do větší 4 ml vialky a bylo přidáno 0,05 M NaOH a 1 ml hexanu. Vzniklé fázové rozhraní bylo zhruba 5 minut protřepáváno na multipozičním vortexu. Poté bylo z horní hexanové fáze odebráno 0,1 ml vzorku a přidáno do čisté vialky. Ke vzorku bylo přidáno 0,9 ml čistého hexanu.

Vzorky proměřené plynovým chromatografem TRACE GC/FID (ThermoFisher Scientific, USA) bylo dále nutno pomocí softwaru Chromeleon přístroje zintegrovat a dále zpracovat. K detekci analytu byl použit plamenově ionizační detektor. Analýza probíhala 60 minut a byly pro ni použity parametry viz Tabulka 6.



Obrázek 5: Ukázka průběhu transesterifikace v termobloku

Tabulka 6: Parametry pro analýzu vzorků na plynovém chromatografu

Front inlet	250 °C, split ratio 10, průtok 1 ml/min, nosný plyn – vodík
Kolona	Zebron ZB-FAME, 30 m x 0,25 mm x 0,20 µm
Detektor	260 °C, air flow 350 ml/min, makeup gas flow 30 ml/min, hydrogen flow 35 ml/min

4.7 Charakterizace extraktů

Extrakty připravené podle postupu v kapitole 4.5.1 na lisu Yoda a podle postupu v kapitole 4.5.2 na automatickém přístroji Soxtherm byly použity pro charakterizaci mastných kyselin na plynovém chromatografu. Ke stanovení dalších bioaktivních sloučenin byla navážka olejů extrahována v polárním rozpouštědle DMSO o koncentraci 0,1 ml oleje na 1 ml rozpouštědla) po dobu 24 hodin. Následně proběhla analýza celkového obsahu fenolických sloučenin, flavonoidů a antioxidační aktivity podle postupů v kapitolách 4.7.2 (fenolické sloučeniny), 4.7.3 (flavonoidy) a 4.7.4 (antioxidační aktivita).

4.7.1 Analyzované vzorky

Analýze byly podrobeny všechny druhy semínek – dýňová (D), sezamová (S), lněná (L) a kmínová (K). V následující tabulce (Tabulka 7) je uveden přehled jednotlivých

analyzovaných olejnatých extraktů, u kterých byl stanoven celkový obsah fenolických sloučenin, flavonoidy, antioxidační aktivity, obsah chlorofylů a karotenoidů.

Tabulka 7: Přehled analyzovaných olejnatých extraktů

Kód vzorku pro olejnaté extrakty	Vzorek
D1	Dýně – extrakt ze Soxthermu z čerstvých semen
D2	Dýně – Extrakt ze Soxthermu z pokrutin z lisu
S1	Sezam – Extrakt ze Soxthermu z pokrutin z lisu
S2	Sezam – Extrakt ze Soxthermu z čerstvých semen
S3	Sezam – Vylisovaný olej
L1	Len – Extrakt ze Soxthermu z pokrutin z lisu
L2	Len – Extrakt ze Soxthermu z čerstvých semen
L3	Len – Vylisovaný olej
K1	Kmín – Vylisovaný olej
K2	Kmín – Extrakt ze Soxthermu z čerstvých semen
K3	Kmín – Extrakt ze Soxthermu z pokrutin z lisu

4.7.2 Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin

Koncentrace fenolických sloučenin byla stanovena spektrofotometricky za použití kyseliny gallové jako standardu.

Do zkumavky byl napipetován 1 ml Follin-Ciocaltautova činidla, které bylo zředěno vodou v poměru 1 : 9. K tomuto byl přidán 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku. Obsah zkumavky byl promíchán a po 5 minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Směs byla znovu promíchána a ponechána 15 minut stát, po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti výchozí hodnotě, kde byla místo vzorku přidána destilovaná voda.

Pro sestrojení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové o koncentraci v rozmezí od 0,1 do 0,7 mg/ml. Ze získaných dat byl sestrojen graf kalibrační závislosti. Celková koncentrace fenolických sloučenin byla vypočítána z rovnice regrese získané z kalibrační závislosti kyseliny gallové. Rovnice regrese je $y = 1,733 \cdot 3x$ ($R^2 = 0,987 \cdot 7$).

4.7.3 Stanovení celkových flavonoidů

Koncentrace flavonoidů byla stanovena spektrofotometricky za použití 1M roztoku katechinu v ethanolu jako standardu.

K 0,5 ml vzorku bylo do zkumavky přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% NaNO₂. Směs byla promíchána a ponechána 5 minut stát. Po uplynutí této doby bylo přidáno 0,2 ml 10% AlCl₃, obsah byl znovu promíchán a znovu ponechán stát po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 1,5 ml NaOH o koncentraci 1 mol/dm³ a 1 ml destilované vody. Vzorek byl opět promíchán a 15 minut ponechán stát. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm. Pro přípravu výchozí hodnoty byl použit stejný postup, místo vzorku byla však přidána destilovaná voda.

Pro sestrojení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada roztoku katechinu o koncentraci v rozmezí od 0,05 do 0,3 mg/ml. Naměřené hodnoty byly zpracovány do grafu

kalibrační závislosti. Celková koncentrace flavonoidů byla poté vypočítána z rovnice regrese získané z kalibrační závislosti katechinu. Rovnice regrese je $y = 3,6767x$ ($R^2 = 0,9991$).

4.7.4 Stanovení antioxidační aktivity

ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě tak, aby měl připravovaný roztok koncentraci 7 mM. Pro vytvoření radikálového kationtu byl roztok smíchán s peroxodisíranem draselným a byl ponechán 12 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Před použitím činidla $ABTS^{\bullet+}$ bylo nutné roztok naředit ethanolem na absorbanci $0,700 \pm 0,02$ při vlnové délce 734 nm proti ethanolu.

Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml $ABTS^{\bullet+}$ a bylo přidáno 10 μ l vzorku. Po deseti minutách od přidání vzorku byl měřen pokles absorbance.

Pro přípravu výchozí hodnoty byl smíchán 1 ml $ABTS^{\bullet+}$ s 10 μ l ethanolu (A_0). Pro sestrojení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada Troloxu rozpuštěného v 60% ethanolu o koncentraci v rozmezí od 50 do 400 ng/ml. Antioxidační aktivita byla poté vypočítána z rovnice regrese získané z kalibrační závislosti Troloxu. Rovnice regrese je $y = 0,0014x$ ($R^2 = 0,9931$).

4.7.5 Stanovení obsahu karotenoidů a chlorofylů

Obsah karotenoidů i chlorofylů byl stanovován spektrofotometricky. V 5 ml acetonu byly rozetřeny 2 g suchého homogenizovaného vzorku a vzniklá směs byla přefiltrována. Filtrát byl převeden a doplněn do 25 ml v odměrné baňce. U takto připravených vzorků byla proměřena absorbance při 663 nm a 645 nm proti acetonu. Koncentrace chlorofylů (mg/ml) byla poté vypočítána podle následujících vztahů, viz rovnice (4.1), (4.2) a (4.3).

$$c_a = 12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} \quad (4.1)$$

$$c_b = 22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663} \quad (4.2)$$

$$c_a + c_b = 8,02 \cdot A_{663} + 20,20 \cdot A_{645} \quad (4.3)$$

c_a = chlorofyl a, c_b = chlorofyl b, $c_a + c_b$ = celkový obsah chlorofylu

Pro stanovení koncentrace karotenoidů byla připravena kalibrační řada o koncentracích 10, 5, 3, 2, 1 a 0,5 μ g/ml postupným ředěním zásobního roztoku standardu β -karotenu v acetonu. Absorbance koncentrační řady β -karotenu byla poté proměřena při vlnové délce 445 nm, kdy se jedná o absorpční maximum β -karotenu. Jednotlivé extrakty extrahované pomocí acetonu v této kapitole byly poté proměřeny spektrofotometricky při vlnové délce 445 nm a z rovnice regrese byl vypočítán obsah karotenoidů ve vzorcích. Celková koncentrace karotenoidů byla poté vypočítána z rovnice regrese získané z kalibrační závislosti β -karotenu. Rovnice regrese je $y = 0,0904x$ ($R^2 = 0,9901$).

4.8 Příprava částic

Připraveny byly dva typy částic. Prvním typem byly alginátové částice s enkapsulovanými proteolytickými enzymy pepsinem a trypsinem připravené pomocí enkapsulátoru (viz kapitola 4.8.1). Druhým typem byly liposomové částice obsahující lipidické extrakty sezamových a dýňových semínek (viz kapitola 4.8.2).

4.8.1 Příprava částic pomocí enkapsulátoru

Částice s enkapsulovanými enzymy byly připraveny pomocí enkapsulátoru Bütchi B-395 Pro o velikosti trysky 450 µm při napětí 2 000 V a frekvenci 4 000 Hz z alginátového roztoku o koncentraci 1,5 % a 1 %. Částice byly 30 minut ponechány ve vytvrzovacím roztoku CaCl₂ a poté byly přefiltrovány do plastových zkumavek k uskladnění. Takto připravené částice byly použity k dalšímu měření.

4.8.2 Příprava liposomových částic

K 10 mg lipidického vzorku bylo přidáno 10 mg cholesterolu a 90 mg sójového lecithinu. Tato směs byla protřepána v 1 ml chloroformu a přidána do 10 ml destilované vody. Poté byla směs ultrazvukována po dobu 1 minuty v přerušovaných intervalech za současného chlazení roztoku vodní lázní. Následně byl roztok po vytěkání chloroformu zcentrifugován po dobu 15 minut při 10 000 otáčkách. Takto připravený vzorek byl použit k testům na buňkách.

4.9 Charakterizace liposomů

4.9.1 Stanovení velikosti částic

Liposomy byly centrifugovány po dobu 5 minut při 6 000 ot./min. Vzniklý supernatant byl odlit a znovu centrifugován po dobu 60 minut při 11 000 ot./min. Stočené liposomy byly rozsuspendovány v destilované vodě a 100x zředěny. V takto připravených vzorcích byla proměřena velikost a polydisperzita částic. Pro stanovení velikosti částic bylo využito dynamického rozptylu světla pomocí přístroje ZetaSizer. Roztoky byly převedeny do kyvety a byla změřena průměrná velikost a polydisperzita částic.

4.10 Modelové trávení

Připravené alginátové částice byly podrobeny modelovému trávení. Byl sledován rozklad částic a uvolňování enzymů postupným průchodem trávicími šťávami. Nejprve byly částice vloženy do žaludeční šťávy na dobu 20 minut při teplotě 37 °C za současného třepání (117 ot/min). Poté byla přidána pankreatická šťáva na dobu 20 minut při teplotě 37 °C, a nakonec žlučová šťáva (v poměru 1 : 1 k pankreatické) na dobu 120 minut při teplotě 37 °C. Po uplynutí každé doby byl odebrán vzorek pro změření koncentrace uvolněných enzymů pomocí Hartree-Lowryho metody.

4.10.1 Složení modelové žaludeční šťávy

Žaludeční šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pepsinu ve 100 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 0,9 (48).

4.10.2 Složení modelové pankreatické šťávy

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g NaHCO₃ ve 100 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,9 (48).

4.10.3 Složení modelové žlučové šťávy

Žlučová šťáva byla připravena rozpuštěním 0,8 g žlučových solí ve 200 ml fosfátového pufru (48).

4.11 Stanovení koncentrace enzymů Hartree-Lowryho metodou

K určení enkapsulační účinnosti byla využita Hartree-Lowryho metoda stanovení koncentrace bílkovin. Připravené částice byly zfiltrovány a ve filtrátu byla stanovena koncentrace bílkovin. Tato koncentrace byla poté porovnána s navážkou vzorku a z rozdílu byla stanovena stabilita alginátových částic. Jako porovnávací vzorek byly použity trávicí šťávy.

4.11.1 Složení použitých činidel

Hartree-Lowryho metoda využívá kolorimetrického stanovení, při němž je využíváno tři činidel. Činidla A a B jsou pro biuretové stanovení, činidlem C je naředěné Folin-Ciocalteuovo činidlo, které je tvořeno polykyselinami fosfomolybdenovou a fosfowolframovou. Ty jsou redukovány tyrosinovými a tryptofanovými zbytky proteinů a barví se modře (49).

Činidlo A: 2 g vínan sodno-draselný tetrahydrát, 500 ml 1M NaOH, 100 g Na₂CO₃, destilovaná voda do 1 l

Činidlo B: 2 g vínan sodno-draselný tetrahydrát, 10 ml 1M NaOH, 1 g CuSO₄ pentahydrát, destilovaná voda do 100 ml

Činidlo C: Folin-Ciocalteuovo činidlo (ředěno 1 : 15 destilovanou vodou)

K 1 ml vzorku obsahujícího enzym bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A. Tento roztok byl inkubován ve vodní lázni při teplotě 50 °C po dobu 10 minut a poté byl ochlazen na laboratorní teplotu. Následně bylo přidáno 0,1 ml Hartree-Lowryho činidla B a roztok byl promíchán a inkubován po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly přidány 3 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a konečný roztok byl promíchán a inkubován ve vodní lázni při teplotě 50 °C po dobu 10 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla u vzorku změřena absorbance při vlnové délce 650 nm (49).

Kalibrační řada byla připravena podle stejného postupu s použitím roztoku albuminu o koncentracích v rozmezí 0,15–0,75 mg/ml.

4.12 Stanovení proteolytické aktivity

Pro stanovení proteolytické aktivity pepsinu a trypsinu bylo použito spektrofotometrické stanovení, při němž byl použit roztok azoalbuminu o koncentraci 5 mg/ml jako substrát. Azoalbumin je modifikovaný protein, který zajistí enzymatickou hydrolýzu, díky které se uvolňují barevné peptidy, které se následně rozpouští v kyselině trichloroctové. Jednotka aktivity je poté stanovena jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu, která se projeví nárůstem absorbance o 0,001 za 1 minutu (50), (51).

100 µl roztoku azoalbuminu bylo smícháno se 100 µl roztoku obsahující enzym a takto připravené vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 60 minut. Reakce byla ukončena přidáním 410 µl 10% kyseliny trichloroctové a vzorky byly zcentrifugovány při 14 000 otáčkách po dobu 2 minut. K 500 µl supernatantu bylo v kyvetě přidáno 700 µl 1 M NaOH. Poté byla změřena absorbance při 440 nm proti blanku. Jako blank byl použit vzorek, do kterého byla přidána kyselina trichloroctová ještě před inkubací.

4.13 Test cytotoxicity

4.13.1 Kultivace Caco-2 buněk

Střevní nádorové Caco-2 buňky byly kultivovány v komerčním médiu Eagle's minimum essential medium (EMEM). Toto médium je obohacené o 2 mM glutamin, 1% směs neesenciálních aminokyselin (NEAA), 10% fetální bovinní sérum (FBS) a 1% směs antibiotik. Kultura byla první a druhý den po rozmrazení zkontrolována pod mikroskopem. Samotná kultivace buněk probíhala v kultivačních lahvích v inkubátoru při teplotě 37 °C, 5% zastoupení CO₂ a 95% vlhkosti.

4.13.2 Příprava testovaných extraktů a kontrolních vzorků

Připravené vzorky extraktů byly sterilně přefiltrovány pomocí bakteriologického filtru (25 mm 0,2 µm PES VWR [514-0073]), jako prevence kontaminace. Takto připravené vzorky byly potom ředěny médiem na požadované koncentrace a poté promíchány. Podobně byly připraveny i kontrolní vzorky.

4.13.3 MTT test cytotoxicity

Pomocí MTT testu byla stanovena cytotoxicita liposomových částic připravených z lipidických extraktů vybraných přírodních látek. Tato metoda využívá (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), tedy MTT. MTT test byl uskutečněn pomocí 96 jamkové destičky, která je tvořena osmi řadami a dvanácti sloupci. Testovány byly liposomy s enkapsulovaným olejem vylišaný ze sezamových semen a z římského kmínu. Jako blank byly ponechány buňky bez vzorků.

Dostatečně narostlé buňky byly zředěny médiem tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 1,5·10⁴ buněk/100 µl. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl takto naředěných buněk. Destička byla zkontrolována pod mikroskopem, jestli se buňky nacházejí v každé jamce. Poté byla ponechána k inkubaci v termostatu po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby bylo z jamek odpipetováno médium a místo něj bylo přidáno 100 µl vzorku o různých koncentracích do každé jamky. Destička byla poté opět ponechána k inkubaci po dobu 24 hodin. Následně byl vzorek odpipetován a místo něj bylo do každé jamky napipetováno 20 µl MTT o koncentraci 2,5 mg/ml v PBS. Buňky byly opět ponechány ke kultivaci v inkubátoru, tentokrát po dobu 3 hodin. Nakonec bylo přidáno 100 µl 10% SDS v PBS. Takto připravená destička byla ponechána po dobu 24 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Na závěr byla pomocí přístroje ELISA reader změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.

4.14 Optimalizace složení navrhovaného doplňku stravy

Na základě výsledků modelového trávení byl vybrán 1% roztok alginátu pro přípravu alginátových kuliček do čokoládových bonbónů. Pro atraktivní tvar byly zvoleny silikonové formičky ve tvaru srdíček pro mléčnou čokoládu a ve tvaru citrusu pro hořkou čokoládu a dále formička ve tvaru medvídků jako zástupce vzorků o menší velikosti.

4.15 Senzorická analýza

Po optimalizaci složení, tvaru a chuti byla připravena senzorická analýza s cílem vybrat optimální vzorek pro finální verzi doplňku stravy.

4.15.1 Pracovní pomůcky

K senzorické analýze bylo použito jednorázové nádobí pro připravené vzorky k hodnocení a papírové kelímky na pití. Jako neutralizátor chuti byla podávána voda.

4.15.2 Senzorické hodnocení

Hodnocení probíhalo během jednoho dne, a to 12.5.2020 v čase od 11 do 15 hodin. Bylo zaměřeno především na konzistenci (texturu) hodnocených vzorků. Hodnocena byla ale také chuť, vzhled a vůně.

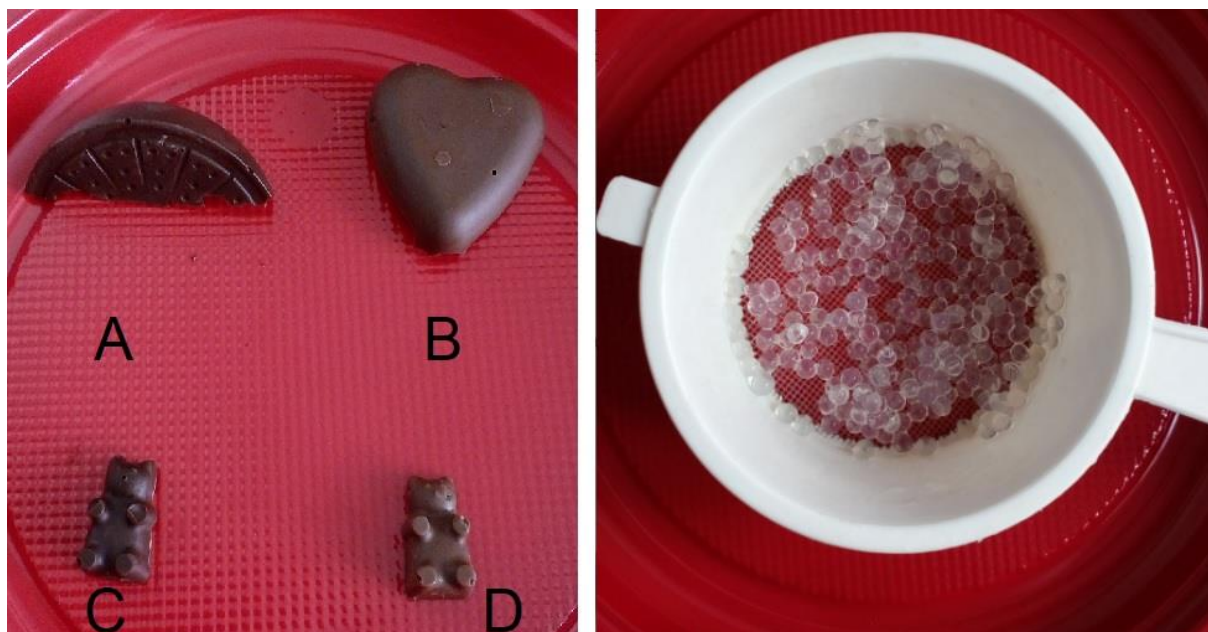
Senzorického hodnocení se zúčastnilo celkem 20 hodnotitelů, z nichž 14 bylo žen a 6 bylo mužů. Pouze 3 hodnotitelé byli kuřáci. Hodnocení se zúčastnili většinou zkušení hodnotitelé z řad studentů, doktorandů a akademických pracovníků Fakulty chemické VUT v Brně. Jejich hodnocení odpovídá hodnocení běžných spotřebitelů.

4.15.3 Analyzované vzorky

Pro senzorické hodnocení byly připraveny vzorky složené z mléčné čokolády (s obsahem kakaové sušiny nejméně 33 %) s přídavkem kuliček z 1% roztoku alginátu vytvrzeného v chloridu vápenatém. Dále byly připraveny vzorky z hořké čokolády (s obsahem kakaové sušiny nejméně 43 %) s přídavkem kuliček z 1% roztoku alginátu vytvrzeného v chloridu vápenatém. Složení těchto vzorků je popsáno v Tabulce 8.

Tabulka 8: Složení preparátů pro senzorické hodnocení

Kód vzorku	Složení čokoládového preparátu
A	Hořká čokoláda – větší vzorek + 1% alginát
B	Mléčná čokoláda – větší vzorek + 1% alginát
C	Hořká čokoláda – menší vzorek + 1% alginát
D	Mléčná čokoláda – menší vzorek + 1% alginát



Obrázek 6: Připravené částice (vlevo) a ukázka alginátových kuliček (vpravo)

4.15.4 Metody použité pro senzorické hodnocení

Při hodnocení bylo využito stupnicové hodnocení a byla hodnocena celková přijatelnost vzorku. Formulář senzorického hodnocení naleznete k nahlédnutí v PŘÍLOHYe.

Pro hodnocení vzhledu, barvy, chutě, vůně a konzistence byla použita pětibodová stupnice (1 vynikající → 5 nevyhovující).

Konzistence jednotlivých vzorků byla hodnocena také pomocí pětibodové stupnice (1 příliš měkká → 5 příliš tuhá). Hodnotitelé měli také za úkol označit nejlepší a nejhorší vzorek.

Poslední částí hodnocení byl pořadový test, kdy hodnotitelé seřadili vzorky dle vlastních preferencí.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předložená diplomová práce byla zaměřena na charakterizaci a izolaci přírodních aktivních látek. Ze semínek rostlin vybraných v této práci byly získány oleje pomocí dvou metod, a to lisováním za studena (na lisu Yoda) anebo automatickou extrakcí hexanem (na Soxthermu). U získaných olejů byl stanoven celkový obsah fenolických sloučenin, flavonoidů, karotenoidů a chlorofylů a antioxidační aktivita, dále byl stanoven profil mastných kyselin. V neposlední řadě byly připraveny a testovány alginátové částice s enkapsulovanými enzymy a liposomální částice s enkapsulovanými oleji. Nakonec bylo navrženo optimální složení dětských doplňků stravy s obsahem zvolených aktivních látek.

5.1 Příprava olejů z vybraných olejnatých semen

Oleje byly získávány pomocí dvou metod, a to lisováním za studena na kuchyňském lisu Yoda a extrakcí organickým rozpouštědlem na automatickém přístroji Soxtherm (viz kapitola 4.5). Výtěžky byly poté porovnány. Oleje byly získávány ze samotných semínek, ale také z pokrutin, které zbyly po lisování za studena. Celý postup je vyobrazen schematicky na Obrázek 2.

5.1.1 Lisování za studena pomocí kuchyňského lisu Yoda

Oleje byly lisovány pomocí kuchyňského lisu Yoda podle návodu v kapitole 4.5.1. Množství oleje bylo přepočítáno na 100 g semínek. Veškeré výtěžky jsou uvedeny v Tabulka 9.

Tabulka 9: Množství vylisovaného oleje z jednotlivých druhů semínek lisem Yoda

druh semínka	výtěžek oleje [g/100 g]	výtěžnost [%]
dýně	–	–
sezam	41,255	41,25
len	17,441	17,44
kmín římský	2,694	2,69

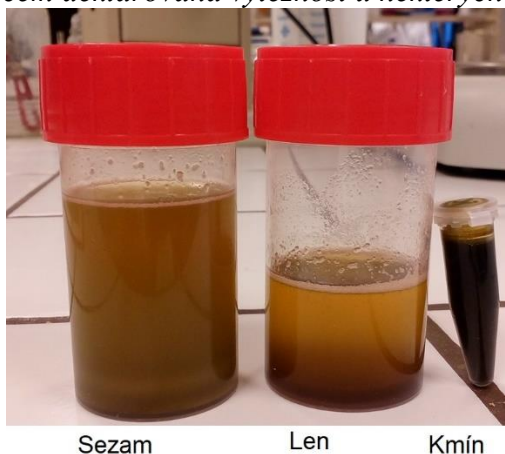
V případě dýňových semínek se pomocí lisu nevylisoval žádný olej, byť výrobce uváděl možnost lisování i dýňových semínek. Chyba mohla nastat v nedostatečném nadrcení dýňových semínek a jelikož teplota lisování nikdy nepřesáhne 40 °C, tak pro vylisování oleje z dýňových semínek může být tato teplota nedostatečná. Z tabulky je patrné, že největší výtěžnost mají sezamová semínka, z nichž byl získán 41,255 g oleje na 100 g semínek. Naopak nejnižší výtěžnost byla v případě římského kmínu a činila 2,694 g oleje na 100 g semínek.

Výrobce lisu Yoda udává výtěžnost u některých druhů semínek, viz Obrázek 7. Z porovnání výtěžnosti v případě sezamových semínek lze vidět, že v tomto případě splňuje deklarovanou hodnotu. Námi získaný výtěžek činí 41,25 %, přičemž deklarovaná výtěžnost je 37–45 % v závislosti na dalších podmínkách (zde na vlhkosti semen). Vylisované oleje lze vidět na Obrázek 8.

Námi naměřená výtěžnost		
Plodina	Váha semínek	Objem vylisovaného oleje
Mák	400g	150 ml
Sezam	1 kg	430 ml
Len	1 kg	390 ml
Ostopestřec	100g	15 ml
Slunečnice	300 g	150 ml
Lísková jádra	200 g	85 ml

Běžná výtěžnost			
Druh semínka	Olejnatosť %	Výtěžnost %	Vliv na výtěžnost
arašídý	40-50	36-42	mnoho druhů arašídů
sezam	40-50	37-45	vlhkost semen
řepka	30-35	23-30	rychlost lisování
slunečnice	45-50	40-45	teplota lisování

Obrázek 7: Výrobce deklarovaná výtěžnost u některých druhů semínek



Obrázek 8: Oleje vylisované na kuchyňském lisu Yoda

5.1.2 Extrakce olejů pomocí přístroje Soxtherm

Oleje (Obrázek 9) byly extrahovány také pomocí přístroje Soxtherm podle návodu uvedeného v kapitole 4.5.2.

Olej byl extrahován ze samotných semínek (Tabulka 10), ale také z pokrutin, které zůstaly po vylisování oleje kuchyňským lisem Yoda (Tabulka 11).



Obrázek 9: Ukázka extrahovaných olejů pomocí přístroje Soxtherm, zleva: kmín, sezam

Tabulka 10: Množství extrahovaného oleje z jednotlivých druhů semínek přístrojem Soxtherm

druh semínka	výtěžek oleje [g/100 g]	výtěžnost [%]
dýně	13,397	13,40
sezam	29,146	29,15
len	14,149	14,15
kmín římský	14,957	14,96

V případě extrakce oleje z celých semínek (viz Tabulka 10), můžeme pozorovat největší výtěžek opět u sezamových semínek, který činí 29,146 g oleje na 100 g sezamu, naopak nejmenšího výtěžku bylo dosaženo v případě dýňových semínek, tedy 13,397 g na 100 g semínek.

Tabulka 11: Množství extrahovaného oleje z pokrutin z lisu přístrojem Soxtherm

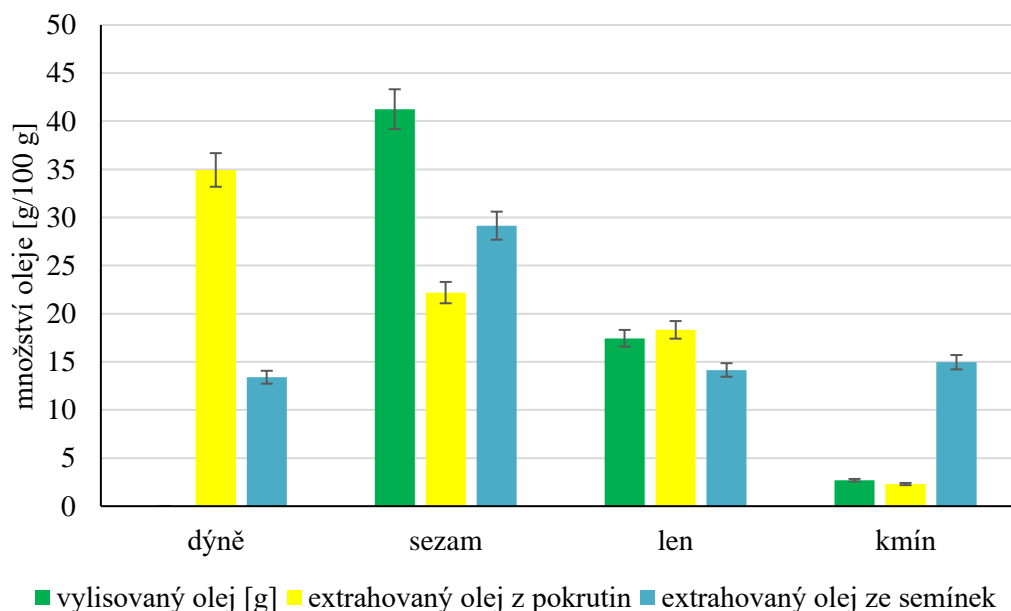
druh pokrutin	výtěžek oleje [g/100 g]	výtěžnost [%]
dýně	34,935	39,93
sezam	22,190	22,19
len	18,318	18,32
kmín římský	2,300	2,30

Po extrakci oleje ze zbytků, jež zůstaly po vylisování oleje lisem Yoda byla vypočtena nejvyšší výtěžnost pro dýňový semínka, tedy 34,935 g oleje na 100 g pokrutin. Tato skutečnost může být způsobena tím, že pomocí lisu Yoda nebyl ze semínek extrahován žádný olej, tudíž jej v pokrutinách zbylo více. Nejmenší výtěžek byl naopak vypočten v případě kmínu, kdy činil 2,300 g oleje na 100 g pokrutin. Po mechanickém lisování zastudena lze tedy dále využívat extrakci olejů nepolárním rozpouštědlem, čímž dojde k nezanedbatelnému zvýšení výtěžnosti olejů a předejde se zbytečným ztrátám využitelných olejů po lisování.

Tabulka 12 shrnuje všechny výtěžky olejů z lisu Yoda i přístroje Soxtherm. Z porovnání zobrazeného v grafu na Obrázek 10 lze vidět, že ve většině případů (kromě římského kmínu) je výtěžek olejů získaný pomocí kuchyňského lisu Yoda vyšší než při extrakci na přístroji Soxtherm. Nejnižších výtěžků se dosáhlo v případě římského kmínu, naopak sezam se jeví jako nejvýtěžnější.

Tabulka 12: Srovnání jednotlivých výtěžků lisování/extrakci

	dýně	sezam	len	kmín
vylisovaný olej [g]	-	41,255	17,441	2,694
extrahovaný olej ze semínek [g]	13,397	29,146	14,149	14,957
extrahovaný olej z pokrutin [g]	34,935	22,190	18,318	2,300



Obrázek 10: Srovnání jednotlivých výtěžků lisování/extrakci

5.2 Určení profilu mastných kyselin

Obsah mastných kyselin byl stanoven v lipidických extraktech získaných pomocí automatického přístroje Soxtherm (viz kapitola 4.5.2), ve vylisovaném oleji získaném pomocí kuchyňského lisu Yoda (viz kapitola 4.5.1) i ve vzorcích pokrutin a samotných semínek podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.

Seznam kyselin, které byly pomocí plynové chromatografie v jednotlivých vzorcích analyzovány je uveden v Tabulka 13.

Tabulka 13: Seznam analyzovaných kyselin

kód kyseliny	název kyseliny	kód kyseliny	název kyseliny
C12:0	dodekanová	C18:2c	linolová
C14:0	myristová	C18:3d3	λ-linolenová
C15:0	pentadekanová	C20:0	arachidová
C16:0	hexadekanová	C20:1	eikosanová
C16:1	palmitová	C20:2	eikosadienová
C18:0	stearová	C22:0	behenová
C18:1t	elaidová	C24:0	lignocerová
C18:1c	olejová		

5.2.1 Profil mastných kyselin – pevné vzorky

K porovnání profilu jednotlivých mastných kyselin z různých kroků zpracování olejnatých semen byla analyzována samotná semínka, dále semínka, u nichž již proběhla extrakce olejů pomocí automatického přístroje Soxtherm a také pokrutiny z lisu Yoda. Seznam všech vzorků je uveden v Tabulka 14. Jak můžeme pozorovat z grafů, tak v pevných vzorcích bylo nalezeno o něco méně kyselin než v případě samotných olejů. Na rozdíl od pevných vzorků byla v olejích analyzována také kyselina C22:0, tedy kyseliny behenová a C24:0 kyselina lignocerová. Také lze konstatovat, že zastoupení mastných kyselin není stejné v případě určitého druhu semínka a samotného oleje, který z tohoto konkrétního semínka pochází. Jako příklad lze uvést sezamové semínko, u kterého byla prokázána kyselina lignocerová C24:0 v případě oleje, ale u pevného vzorku analyzována nebyla. Stejně tak je tomu u kyseliny λ -linolenové C18:3d3, která byla prokázána v případě sezamového oleje, ale ne v případě sezamového semínka.

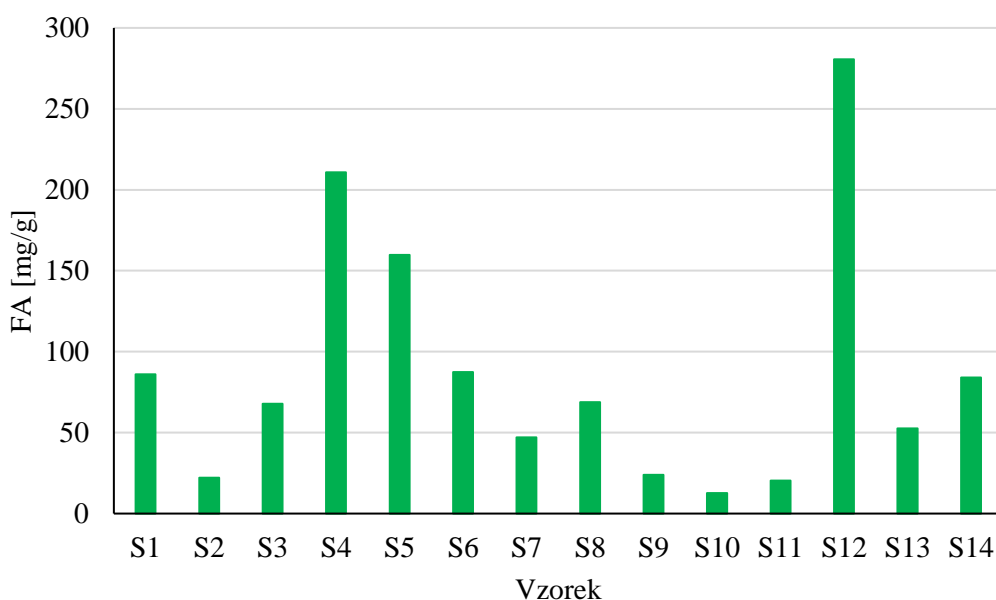
Tabulka 14: Seznam analyzovaných vzorků – pevné vzorky

Kód vzorku	Vzorek
S1	sezamové semínko
S2	pokrutiny ze lnu
S3	pokrutiny z dýně
S4	pokrutiny ze sezamu
S5	kmínové semínko
S6	dýňové semínko
S7	pokrutiny z kmínu
S8	lněné semínko
S9	sezamová semínka po extrakci na Soxthermu
S10	kmínová semínka po extrakci na Soxthermu
S11	lněná semínka po extrakci na Soxthermu
S12	dýňová semínka po extrakci na Soxthermu

Z porovnání celkového obsahu mastných kyselin mezi pevnými vzorky a oleji lze vidět, že v případě olejů došlo jednoznačně k lepší analýze, byl prokázán mnohem vyšší obsah celkových mastných kyselin. Toto může být dáno i tím, že oleje jsou celkově pro analýzu přístupnější a například u analýzy složení samotných semínek mohlo být potřebné alespoň nějakým způsobem narušit daný pevný vzorek (semínko, pokrutinu), tedy jej pomlít, či nadrtit. Celkové množství analyzovaných mastných kyselin a zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin je zobrazeno v Tabulka 15 a graficky znázorněno na Obrázek 11. Zajímavé je, že v případě vzorku S10 nebyly analyzovány žádné mononenasycené mastné kyseliny.

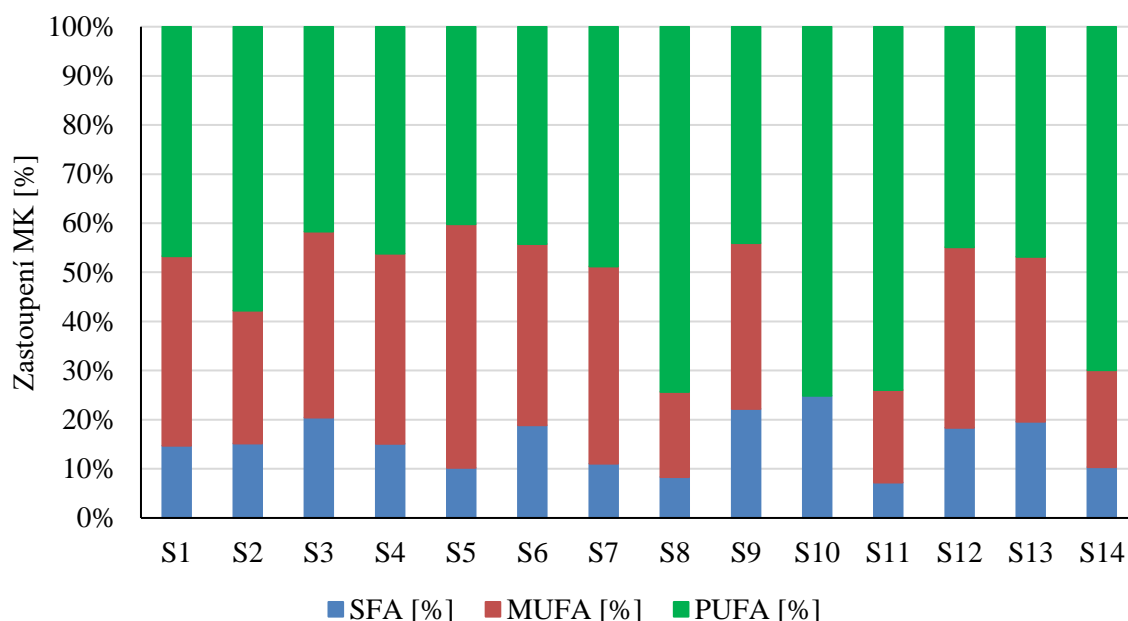
Tabulka 15: Množství analyzovaných mastných kyselin a zastoupení nasycených/nenasycených u pevných vzorků

vzorek	FA [mg/g]	SFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
S1	85,93	14,68	38,60	46,73
S2	22,18	15,16	27,08	57,77
S3	67,85	20,43	37,88	41,70
S4	210,89	15,13	38,68	46,19
S5	159,75	10,25	49,57	40,20
S6	87,38	18,86	36,90	44,24
S7	47,04	11,03	40,17	48,80
S8	68,78	8,32	17,33	74,36
S9	23,89	22,22	33,76	44,03
S10	12,60	24,88	0,00	75,12
S11	20,29	7,22	18,82	73,95
S12	280,59	18,35	36,79	44,86

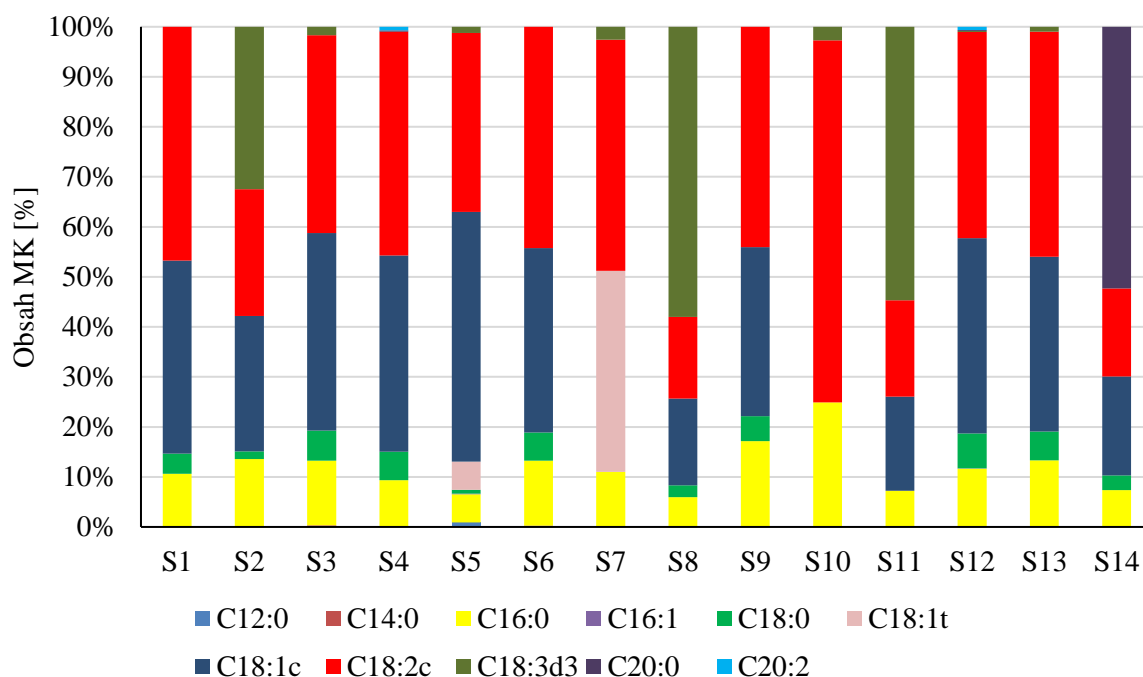


Obrázek 11: Množství mastných kyselin v jednotlivých pevných vzorcích

Na Obrázek 12 lze vidět, že zastoupení nenasycených mastných kyselin výrazně převyšuje zastoupení nasycených mastných kyselin. Nenasycené mastné kyseliny jsou pro člověka velice důležité nejen z hlediska prevence různých onemocnění (viz kapitola 2.3.1).



Obrázek 12: Zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin v pevných vzorcích



Obrázek 13: Porovnání obsahu mastných kyselin v jednotlivých pevných vzorcích

V grafu na Obrázek 13 jsou zobrazeny všechny analyzované mastné kyseliny v jednotlivých pevných vzorcích. Je zřejmé, že vysoký podíl mastných kyselin tvoří kyselina linolová (C18:2c), dále kyselina olejová (C18:1c). Poté je v těchto vzorcích nejobsaženější kyselina C16:0, tedy kyselina hexadekanová. V případě vzorků S7, tedy pokrutin z kmínu je velké množství kyseliny elaidové (C18:1t), která ve většině ostatních vzorků zcela chybí. Naopak je u tohoto vzorku absence kyseliny olejové, stejně jako u vzorku S10 (kmínový semínka po extrakci na Soxthermu), která se jinak vyskytuje ve vysokém množství u všech ostatních analyzovaných vzorků.

5.2.2 Profil mastných kyselin u olejů

V případě olejů byly analyzovány oleje vylisované zastudena kuchyňským lisem Yoda, dále oleje získané extrakcí na automatickém přístroji Soxtherm přímo ze semínek a také olej získaný extrakcí na automatickém přístroji Soxtherm z pokrutin, které zbyly po lisování na lisu Yoda. Přehled analyzovaných vzorků je uveden v Tabulka 16.

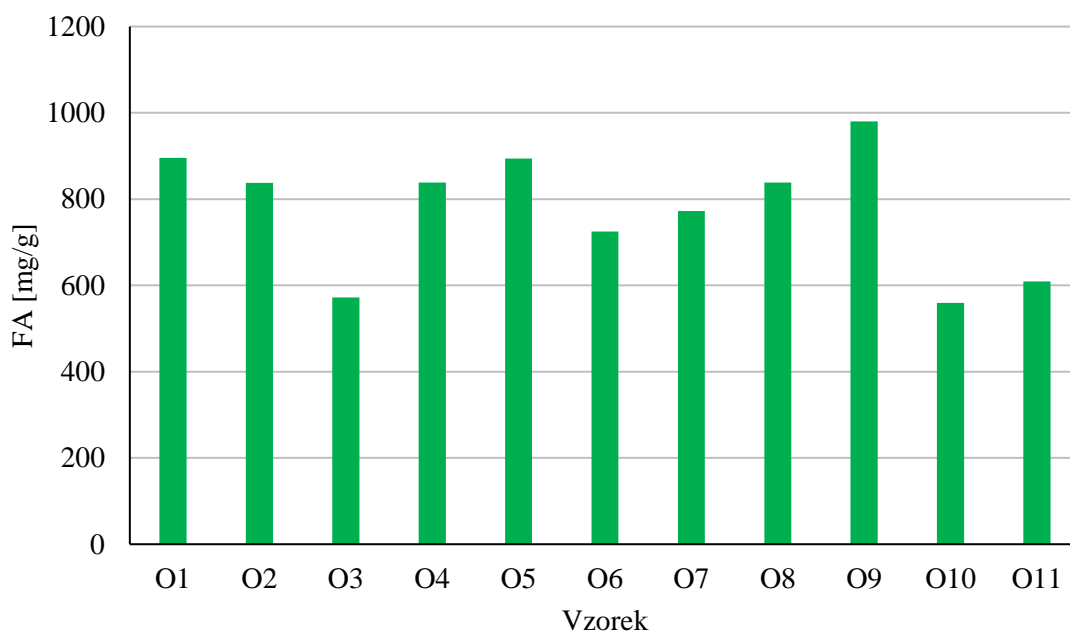
Tabulka 16: Seznam analyzovaných vzorků – oleje

Kód vzorku	Druh oleje
O1	lněný z lisu
O2	sezamový z lisu
O3	kmínový z lisu
O4	lněný ze Soxthermu
O5	sezamový ze Soxthermu
O6	kmínový ze Soxthermu
O7	dýňový ze Soxthermu
O8	z lněných pokrutin po Soxthermu
O9	ze sezamových pokrutin ze Soxthermu
O10	z kmínových pokrutin ze Soxthermu
O11	z dýňových pokrutin ze Soxthermu

Na základě hodnot v Tabulka 17 lze konstatovat, že metoda zisku oleje nemá přílišný vliv na celkové množství mastných kyselin, které získaný olej obsahuje. Například v případě lněného oleje (vzorek O1), který byl získán lisováním za studena na lisu Yoda byl naměřený obsah mastných kyselin 895,65 mg/g a u lněného oleje, který byl získán z totožného druhu lněného semínka extrakcí pomocí automatického přístroje Soxtherm (vzorek O4) byla naměřená hodnota celkových mastných kyselin 838,56 mg/g. Podobné je také zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin, kdy u vzorku O1 je procentuální podíl MUFA 19,92 % a PUFA 70,30 % a u vzorku O4 je podíl MUFA 19,94 % a PUFA 69,75 %. Z grafu, který je vyobrazen na Obrázek 14 lze říci, že jak v případě extrakce na Soxthermu, tak v případě lisování na lisu Yoda bylo nejméně mastných kyselin obsaženo ve vzorcích O3 (kmínový olej z lisu), kdy hodnota mastných kyselin činila 572,19 mg/g a O6 (kmínový olej ze Soxthermu), kdy hodnota mastných kyselin činila 724,79 mg/g. Také v případě pokrutin, které zbyly po vylisování oleje na lisu Yoda a byl z nich olej extrahován na automatickém přístroji Soxthermu byly analyzovány relativně vysoké obsahy celkových mastných kyselin. Proto je také v dnešní době již relativně běžné získávání olejů extrakcí rozpouštědlem, aby se co nejvíce maximalizovaly výtěžky olejů a minimalizoval se neúčinný odpad. Tento postup je typický například při získávání olivového oleje (52).

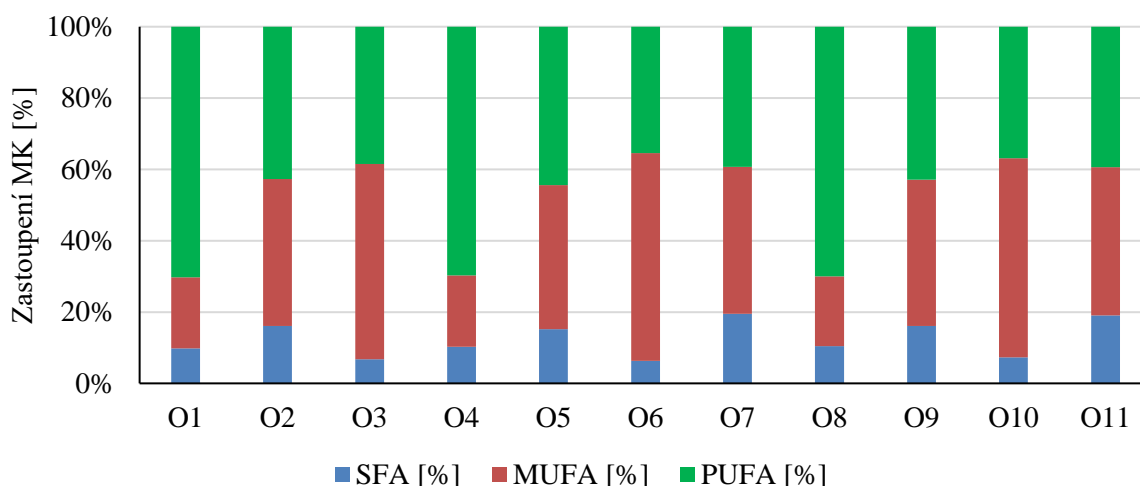
Tabulka 17: Množství analyzovaných mastných kyselin a zastoupení nasycených/nenasycených u olejů

vzorek	FA [mg/g]	SFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
O1	895,65	9,79	19,92	70,30
O2	837,98	16,13	41,19	42,69
O3	572,19	6,77	54,73	38,51
O4	838,56	10,30	19,94	69,75
O5	893,90	15,20	40,38	44,42
O6	724,79	6,31	58,26	35,44
O7	772,12	19,43	41,11	39,24
O8	838,69	10,41	19,61	69,99
O9	979,96	16,10	41,02	42,88
O10	559,11	7,27	55,87	36,87
O11	608,84	19,08	41,54	39,39

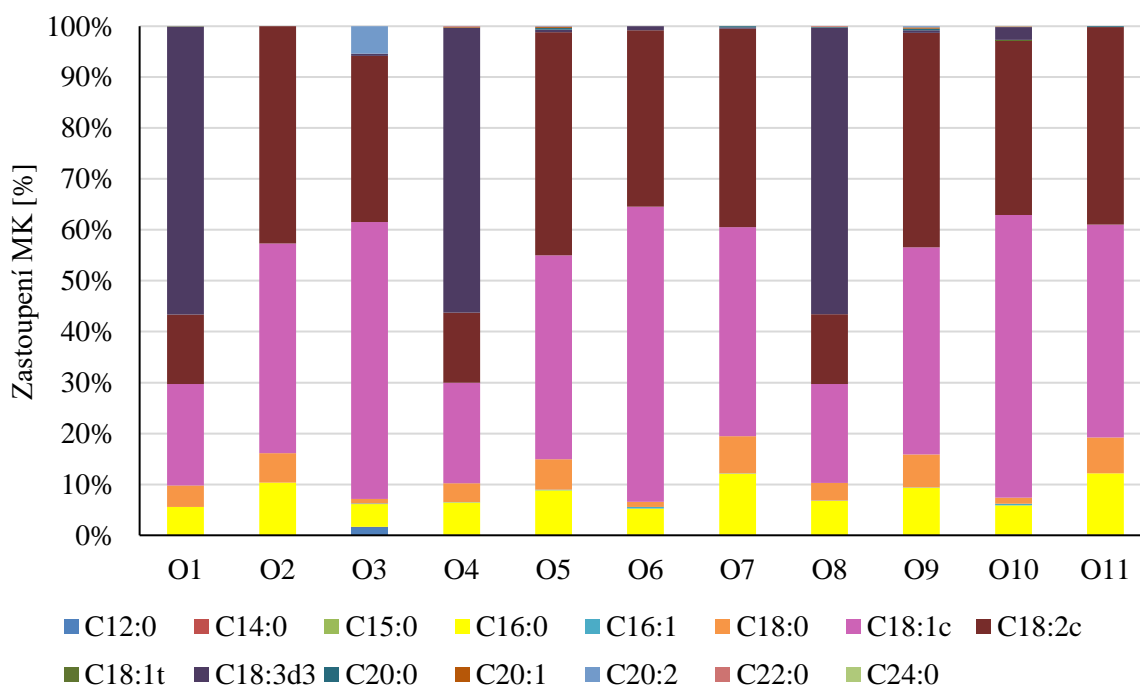


Obrázek 14: Množství mastných kyselin ve vzorcích olejů

Z grafu na Obrázek 15 je zřetelné, že v analyzovaných olejích výrazně převažují nenasycené mastné kyseliny nad kyselinami nasycenými. Na Obrázek 16 je přehledně zobrazeno složení mastných kyselin v jednotlivých olejích. Lze pozorovat, že téměř u všech vzorků jsou ve výrazné převaze C18:1c a C18:2c kyseliny, tedy kyselina olejová a linolová. U vzorků O1, O4 a O8 je vidět také vysoký výskyt C18:3d3, tedy kyseliny λ -linolenové.



Obrázek 15: Zastoupení nasycených/nenasycených mastných kyselin ve vzorcích olejů



Obrázek 16: Zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích olejů

5.3 Charakterizace extraktů

Olejnate extrakty jednotlivých semínek byly charakterizované z hlediska obsahu a profilu jednotlivého zastoupení mastných kyselin, celkového obsahu fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity. Profil jednotlivého zastoupení mastných kyselin byl také stanoven v případě lyofilizovaných semínek.

5.3.1 Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin

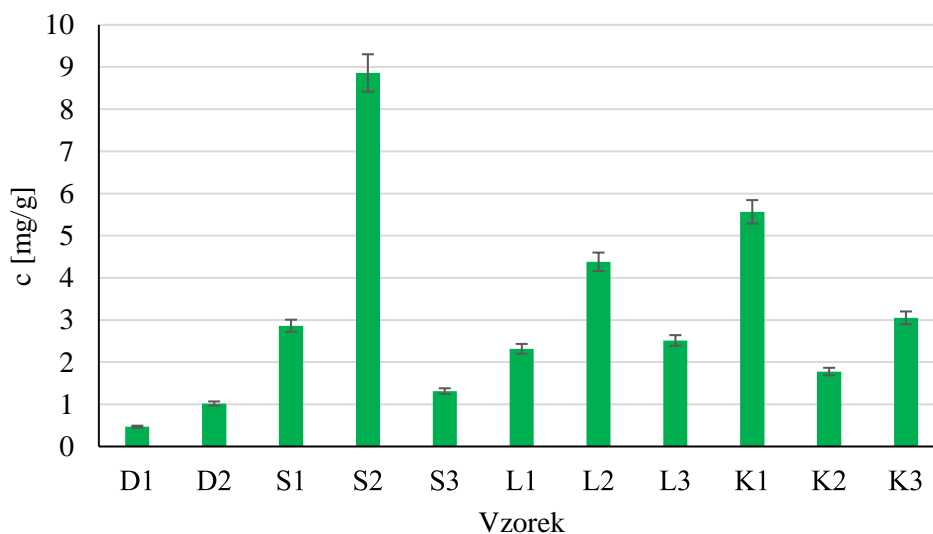
Pro určení celkové koncentrace fenolických sloučenin byla nedříve sestrojena kalibrační závislost absorbance celkového obsahu fenolických sloučenin na koncentraci, podle postupu v kapitole 4.7.

Celková koncentrace fenolických sloučenin byla poté vypočítána z rovnice regrese získané z kalibrační závislosti kyseliny gallové. Rovnice regrese je $y = 1,733 \cdot 3x$ ($R^2 = 0,9877$).

Jednotlivé vzorky byly proměřeny vždy třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledná koncentrace fenolických sloučenin byla přepočítána na obsah fenolických sloučenin v miligramech na 1 g vzorku. Přehled měřených vzorků a jejich kódování je uvedeno v Tabulka 7.

Tabulka 18: Vypočítaný obsah fenolických sloučenin v olejnatých extraktech

vzorek	Obsah fenolických sloučenin v roztoku [mg/g]
D1	$0,470 \pm 0,214$
D2	$1,018 \pm 0,023$
S1	$2,864 \pm 0,614$
S2	$8,859 \pm 0,829$
S3	$1,315 \pm 0,197$
L1	$2,317 \pm 0,361$
L2	$4,380 \pm 0,256$
L3	$2,515 \pm 0,148$
K1	$5,566 \pm 0,216$
K2	$1,777 \pm 0,309$
K3	$3,050 \pm 1,002$



Obrázek 17: Obsah celkových fenolických sloučenin v olejnatých extraktech

Z výsledků, které jsou uvedeny v Tabulka 18 můžeme vidět, že fenolické sloučeniny jsou ve vybraných semínkách zastoupeny v poměrně malém množství. Tato skutečnost může být způsobena například pracovní teplotou Soxthermu při extrakci, v případě lisu to může být teplotou šneku lisu při zahřívání. Také může mít vliv čerstvost vylisovaných olejů nebo samotných semínek. Čím delší dobu jsou oleje vylisované, tím více se koncentrace fenolických sloučenin může snižovat.

Nejvíce fenolických sloučenin obsahuje vzorek S2, tedy olej získaný extrakcí čerstvých sezamových semínek pomocí přístroje Soxtherm, konkrétně $8,856 \pm 0,829$ mg/g a dále vzorky

K1, tedy olej ze semen římského kmínu získaný kuchyňským lisem Yoda s koncentrací $5,566 \pm 0,216$ mg/g a vzorek L2, tedy olej získaný extrakcí čerstvých lněných semínek pomocí přístroje Soxtherm, a to $4,380 \pm 0,256$ mg/g. Naopak nejnižší množství celkových fenolických sloučenin bylo naměřeno ve vzorku D1, tedy v extrakt ze Soxthermu z čerstvých semen dýně, a to $0,470 \pm 0,214$ mg/g.

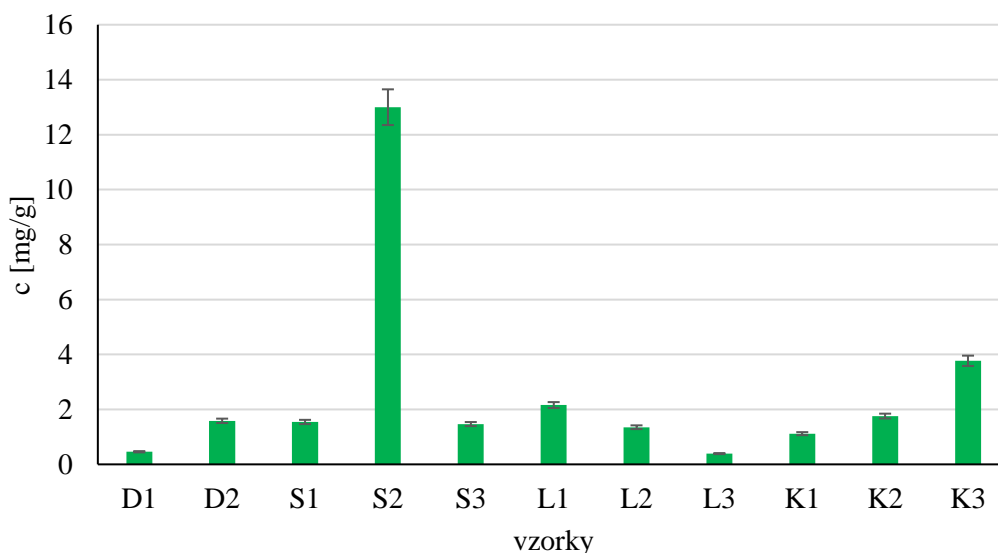
5.3.2 Stanovení celkových flavonoidů

Pro stanovení celkových flavonoidů byla nejprve sestrojena kalibrační závislosti podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.3. Celková koncentrace flavonoidů byla poté vypočítána z rovnice regrese získané z kalibrační závislosti katechinu. Rovnice regrese je $y = 3,6767x$ ($R^2 = 0,9991$).

Celková koncentrace flavonoidů byla stanovena opět fotometricky a každý vzorek byl proměřen třikrát. Hodnoty absorbancí poté byly zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka. Výsledná koncentrace byla přepočítána na obsah flavonoidů v miligramech na 1 g vzorku. Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 19, graficky jsou poté znázorněny v grafu na Obrázek 18.

Tabulka 19: Vypočítaný obsah flavonoidů v olejnatých extraktech

vzorek	Obsah flavonoidů v roztoku [mg/g]
D1	$0,459 \pm 0,235$
D2	$1,585 \pm 0,048$
S1	$1,543 \pm 0,082$
S2	$12,999 \pm 1,537$
S3	$1,467 \pm 0,065$
L1	$2,158 \pm 0,331$
L2	$1,352 \pm 0,429$
L3	$0,391 \pm 0,073$
K1	$1,117 \pm 0,131$
K2	$1,758 \pm 1,399$
K3	$3,769 \pm 0,025$



Obrázek 18: Obsah celkových flavonoidů v olejnatých extraktech

Stejně jako v případě fenolických sloučenin můžeme největší zastoupení flavonoidů pozorovat u vzorku S2, tedy u oleje získaného extrakcí čerstvých sezamových semínek pomocí přístroje Soxtherm, a to v množství $12,999 \pm 1,537$ mg/g. Ostatní vzorky mají množství celkových flavonoidů podobné, nejméně jich obsahuje vzorek L3, tedy olej získaný pomocí kuchyňského lisu Yoda, a to $0,391 \pm 0,073$ mg/g.

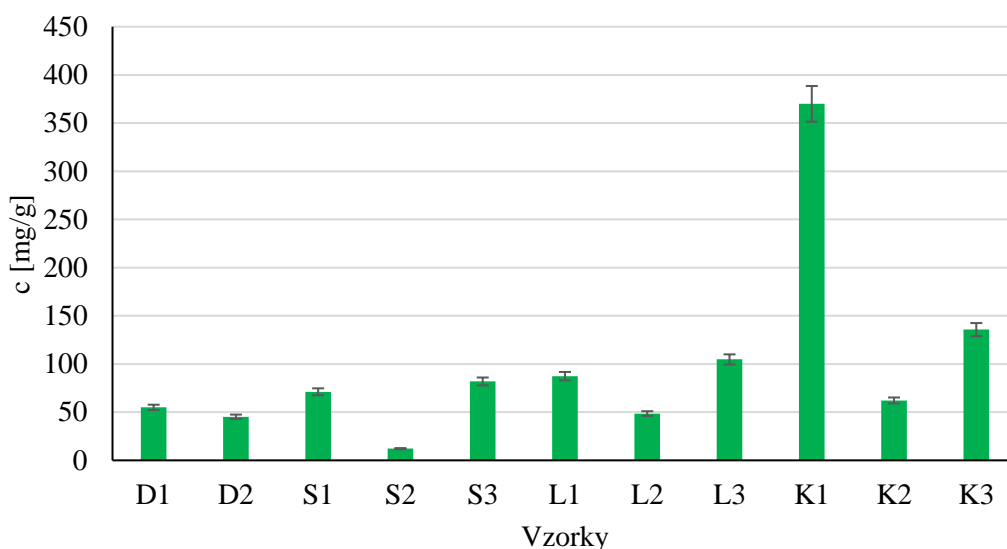
5.3.3 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla stanovena podle postupu v kapitole 4.7.4. Pro výpočet antioxidační aktivity byla nejprve sestavena kalibrační křivka Troloxu. Antioxidační aktivita byla poté vypočítána z rovnice regrese získané z kalibrační závislosti Troloxu rozpuštěného v 60% ethanolu. Rovnice regrese je $y = 0,0014x$ ($R^2 = 0,993$ 1).

Všechny vzorky byly třikrát proměřeny a z těchto naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledná antioxidační aktivita byla vypočtena v mg/g.

Tabulka 20: Vypočítaná antioxidační aktivita olejnatých extraktů

vzorek	Antioxidační aktivita [mg/g]
D1	$55,000 \pm 5,210$
D2	$45,238 \pm 4,253$
S1	$71,190 \pm 4,073$
S2	$12,143 \pm 11,399$
S3	$81,905 \pm 3,786$
L1	$87,381 \pm 7,912$
L2	$48,571 \pm 7,114$
L3	$104,762 \pm 3,348$
K1	$370,000 \pm 1,179$
K2	$62,143 \pm 8,894$
K3	$135,714 \pm 6,191$



Obrázek 19: Antioxidační aktivita olejnatých extraktů

Z hodnot uvedených v Tabulka 20 a z grafického vyjádření těchto hodnot na Obrázek 19 je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu má vzorek K1, tedy olej ze semen římského kmínu získané kuchyňským lisem Yoda. Tato aktivita činí $370,000 \pm 1,179$ mg/g. Odlišnost antioxidační aktivity od extrahovaného oleje pomocí přístroje Soxtherm je velká a je pravděpodobně způsobena nepolárním rozpouštědlem (hexanem) použitým při samotné extrakci. Při použití hexanu dochází v případě kmínového oleje ke zhoršení antioxidačních vlastností, které by mohly být zachovány použitím nějakého polárního rozpouštědla, například methanolu (53).

V případě ostatních vzorků je antioxidační aktivita velmi podobná a pohybují se v rozmezí od $135,714 \pm 6,191$ do $45,238 \pm 4,253$ mg/g. Nejnižší antioxidační aktivitu má vzorek S2, tedy olej získaný extrakcí čerstvých sezamových semínek pomocí přístroje Soxtherm, u kterého ale byla naměřen nejvyšší obsah fenolických sloučenin a flavonoidů. Jeho antioxidační aktivita činí pouhých $12,143 \pm 1,140$ mg/g.

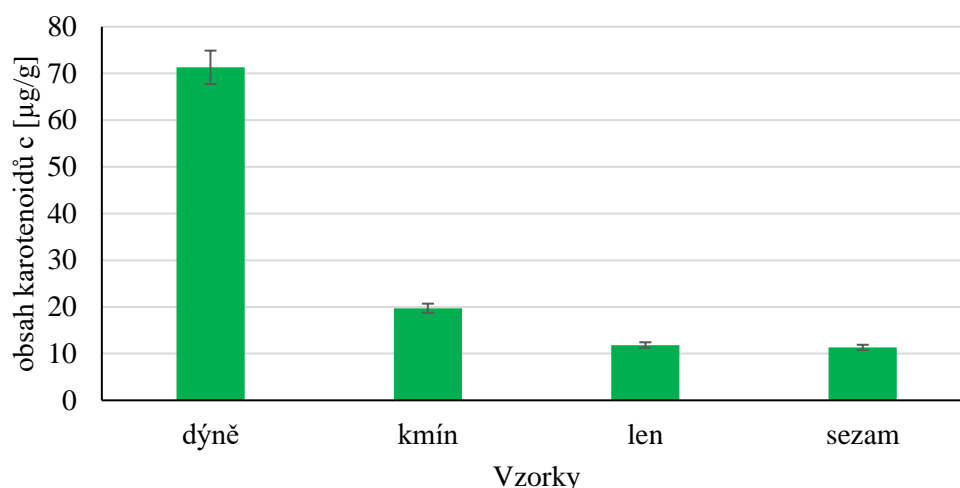
5.3.4 Stanovení obsahu karotenoidů a chlorofylů

Obsah karotenoidů ve vzorcích byl stanoven podle postupu z kapitoly 4.7.5. Nejprve byly naměřeny hodnoty pro kalibrační křivku pomocí standardního roztoku β -karotenu. Celková koncentrace karotenoidů byla poté vypočítána z rovnice regrese získané z kalibrační závislosti β -karotenu. Rovnice regrese je $y = 0,0904x$ ($R^2 = 0,9901$).

Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot absorbancí byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Koncentrace zastoupených karotenoidů v $\mu\text{g/g}$ je znázorněna v Tabulka 21 a na Obrázek 20.

Tabulka 21: Obsah karotenoidů ve vzorcích semen

vzorek	karotenoidy [$\mu\text{g/g}$]
dýně	$71,316 \pm 0,670$
kmín	$19,718 \pm 0,317$
len	$11,841 \pm 0,156$
sezam	$11,335 \pm 0,237$



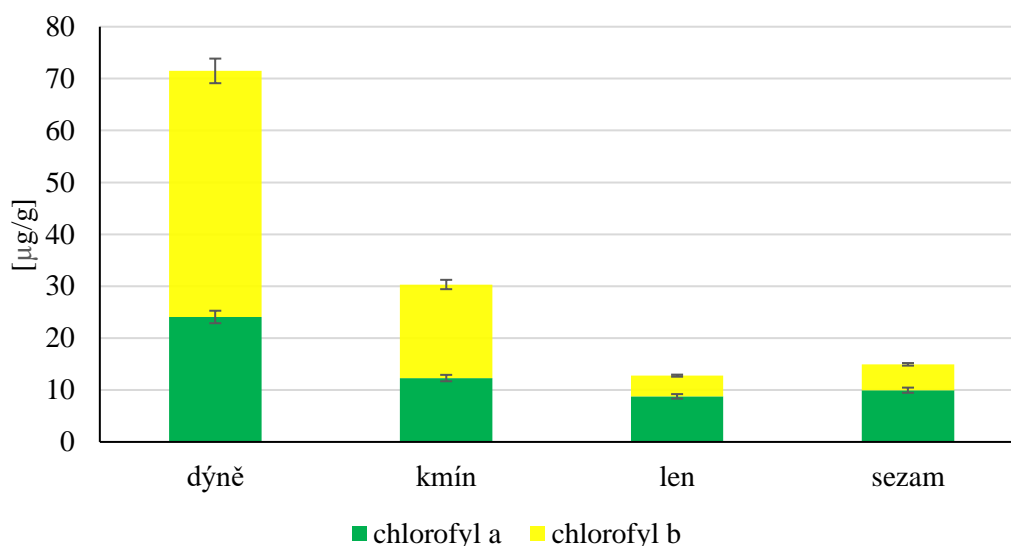
Obrázek 20: Obsah karotenoidů ve vzorcích semen

Nejvyšší obsah karotenoidů obsahují podle naměřených hodnot semínka dýně, a to $71,316 \pm 0,670 \mu\text{g/g}$. Ostatní tři druhy semínek mají koncentrace karotenoidů podobné a pohybují se v rozmezí od $19,718 \pm 0,317 \mu\text{g/g}$ do $11,335 \pm 0,237 \mu\text{g/g}$, přičemž tuto nejnižší hodnotu mají sezamová semínka.

Obsah chlorofylů byl stanoven stejným způsobem jako obsah karotenoidů, podle postupu v kapitole 4.7.5 a následný výpočet byl proveden podle rovnic ve stejné kapitole. Z grafického znázornění na Obrázek 21 lze vidět, že většinové zastoupení má chlorofyl b, přičemž nejvyšší obsah chlorofylu a i b obsahuje dýně, stejně jako v případě karotenoidů. Celkový obsah chlorofylů u dýně činí $71,463 \pm 0,542 \mu\text{g/g}$, z čehož $24,075 \pm 0,438 \mu\text{g/g}$ tvoří chlorofyl a $47,414 \pm 0,104 \mu\text{g/g}$ tvoří chlorofyl b. Nejnižší celkový obsah chlorofylů má naopak len, který jich obsahuje $12,763 \pm 0,674 \mu\text{g/g}$.

Tabulka 22: Obsah chlorofylů ve vzorcích semen

vzorek	chlorofyl a [$\mu\text{g/g}$]	chlorofyl b [$\mu\text{g/g}$]	celkový obsah chlorofylů [$\mu\text{g/g}$]
dýně	$24,075 \pm 0,438$	$47,413 \pm 0,104$	$71,463 \pm 0,542$
kmín	$12,304 \pm 0,029$	$18,027 \pm 0,991$	$30,321 \pm 0,961$
len	$8,779 \pm 0,333$	$3,988 \pm 0,340$	$12,763 \pm 0,674$
sezam	$9,965 \pm 0,904$	$4,983 \pm 0,109$	$14,944 \pm 1,012$



Obrázek 21: Obsah chlorofylů ve vzorcích semen

5.4 Příprava a charakterizace liposomů

K enkapsulaci do liposomů byly vybrány dva typy olejů, a to sezamový a kmínový, u kterých byly stanoveny vysoké hodnoty antioxidační aktivity. Tyto liposomy byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.8.2. Částice byly následně charakterizovány metodou DLS přístroje ZetaSizer, Malvern (UK) a byla u nich změřena cytotoxicita pomocí MTT testu.

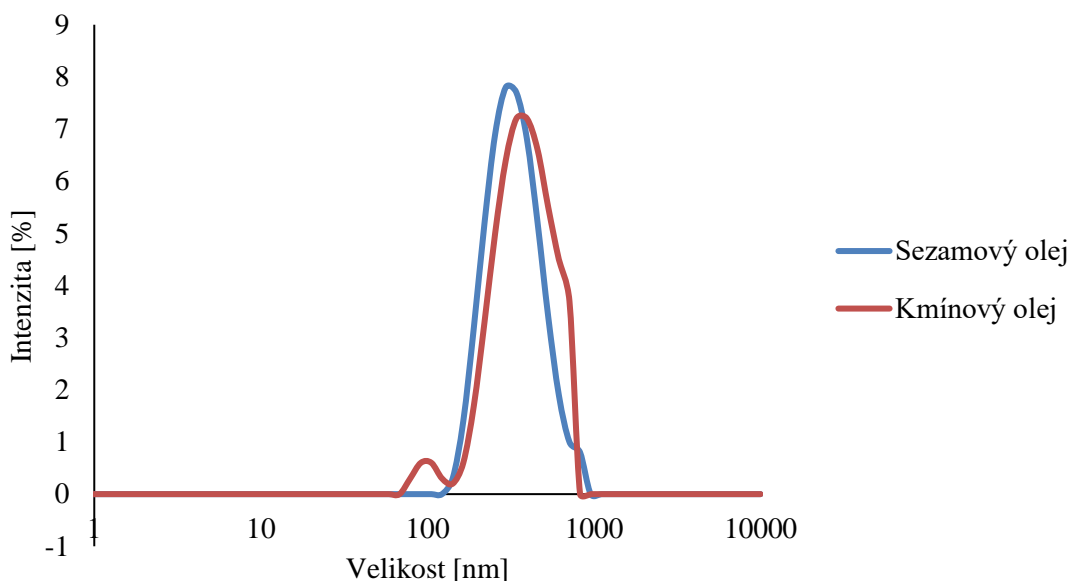
5.4.1 Stanovení velikosti liposomových částic

Velikost a polydisperzita připravených liposomových částic byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 4.9.1. Naměřené hodnoty lze vidět v Tabulka 23.

Tabulka 23: Průměrná velikost a polydisperzita připravených liposomů

Druh oleje	Průměrná velikost částic [nm]	Polydisperzita [-]
sezamový	253,07	0,531
kmínový	241,70	0,702

Z naměřených hodnot lze konstatovat, že průměrná velikost liposomových částic je u obou typů olejů podobná. Co se týče polydisperzity, hodnoty jsou poměrně vysoké a mohlo tedy docházet k agregaci částic. V případě sezamového oleje je index o něco nižší než v případě oleje kmínového, u kterého lze dle grafu (Obrázek 22) vidět, že obsahoval i částice s velikostí kolem 100 nm. Pro využití menších částic (menších liposomů) by bylo nutné částice například přefiltrovat nebo centrifugovat. Použitím menších částic by se mohl zlepšit průnik (a tím i účinnost) liposomů v místě určení.



Obrázek 22: Distribuce velikosti částic připravených liposomů

5.5 Příprava alginátových částic a stanovení jejich stability v modelovém prostředí trávicího traktu

Alginátové částice s enkapsulovanými proteolytickými enzymy pepsinem a trypsinem byly připraveny pomocí enkapsulátoru dle postupu uvedeného v kapitole 4.8.1. Stabilita vytvořených alginátových částic byla pozorována změřením koncentrace uvolněných bílkovin pomocí Hartree-Lowryho metody (viz kapitola 4.11) během modelového trávení. Vypočítán byl procentuální podíl uvolněného enzymu z celkového enkapsulovaného množství. Enkapsulovány byly celkem tři druhy enzymů – trypsin, pepsin a jejich kombinace. Vzorby byly měřeny v triplicátech, které byly následně zprůměrovány. Stabilita byla pozorována u částic připravených z 1% a 1,5% roztoku alginátu s enkapsulovanými enzymy a vytvrzeny v 1,5% roztoku chloridu vápenatého po dobu 30 minut.

Z výsledků uvedených v Tabulka 24 a Tabulka 25 můžeme vidět, že v případě trypsinu probíhá uvolňování výrazně rychleji než u pepsinu či kombinace pepsinu a trypsinu. Tato skutečnost může být způsobena například strukturou trypsinu, který sám o sobě může způsobovat rychlejší rozpad alginátových částic a snadněji difundovat do prostředí. Naopak samotný pepsin se z alginátových částic uvolňuje nejpomaleji, vliv může mít i výskyt pepsinu právě v žaludečních šťávách.

Pro použití do enzymatických doplňků stravy se zdá jako vhodnější nosič enzymů 1% alginát. Tyto doplňky stravy se většinou konzumují spolu s jídlem pro podporu trávení, ať už v případě chronických onemocnění nebo pro pouhou podporu trávení a je tedy žádoucí, aby se enzymy uvolňovaly sice postupně, ale ne příliš pomalu, aby plnily svou funkci.

Tabulka 24: Procentuální podíl uvolněných enzymů z 1% alginátových částic

Enkapsulovaný enzym	Uvolněné enzymy [%]	
	30 min trávení	60 min trávení
Trypsin	22,85	45,70
Pepsin	7,63	13,88
Trypsin + pepsin	9,00	18,76

Tabulka 25: Procentuální podíl uvolněných enzymů z 1,5% alginátových částic

Enkapsulovaný enzym	Uvolněné enzymy [%]	
	30 min trávení	60 min trávení
Trypsin	19,93	29,22
Pepsin	6,64	11,48
Trypsin + pepsin	8,60	18,54

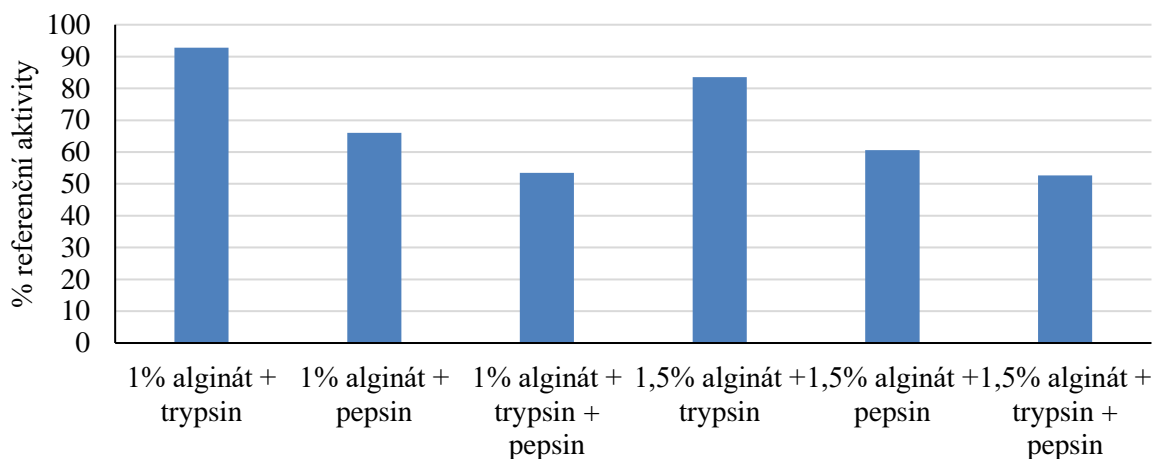
5.6 Stanovení proteolytické aktivity enkapsulovaných enzymů

Proteolytická aktivita byla stanovena pomocí metody popsané v kapitole 4.12. Pro každý enzym byla stanovena referenční hodnota proteolytické aktivity při známém množství enzymu. Po zjištění množství uvolněného enzymu pomocí Hartree-Lowryho metody (viz kapitola 4.11) byla naměřená aktivita porovnána s referenční aktivitou a výsledek vyjádřen jako procentuální podíl referenční aktivity při stejném množství enzymu (viz Tabulka 26).

Tabulka 26: Výsledky stanovení referenční aktivity

	% referenční aktivity
1% alginát + trypsin	92,82
1% alginát + pepsin	66,07
1% alginát + trypsin + pepsin	53,43
1,5% alginát + trypsin	83,55
1,5% alginát + pepsin	60,60
1,5% alginát + trypsin + pepsin	52,62

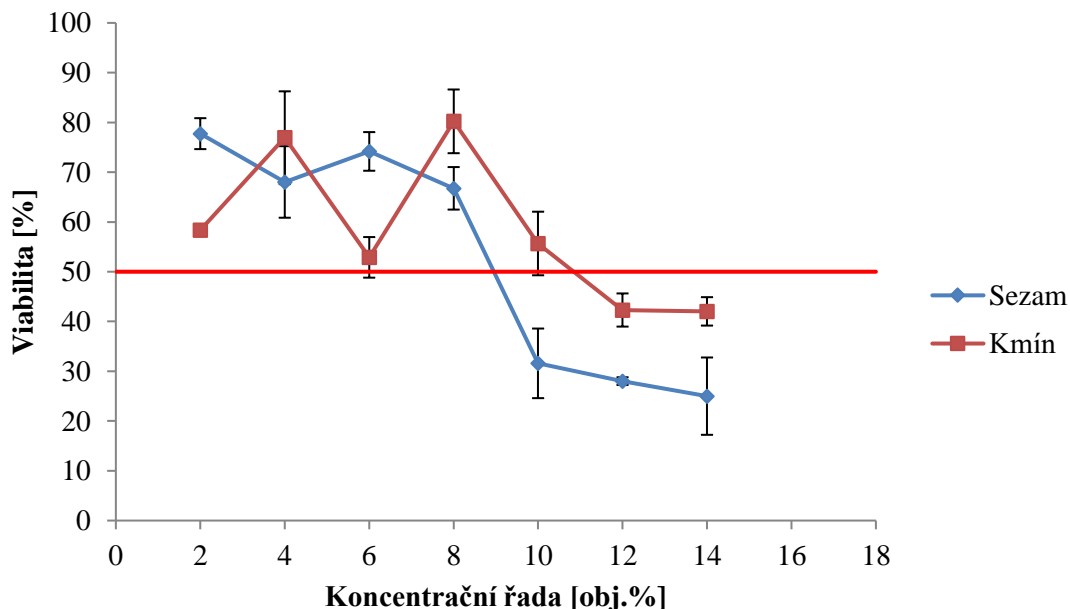
V případě všech částic byla potvrzena proteolytická aktivita. Z výsledků, které jsou graficky vyobrazeny na Obrázek 23 lze říci, že v případě trypsinu je aktivita nejvyšší (také právě trypsinu bylo nejvíce uvolněného, viz výsledky v kapitole 5.5), naopak u směsi enzymů, kdy jich bylo uvolněno ze všech nejméně (viz kapitola 5.5), byla zjištěna nejnižší proteolytická aktivita.



Obrázek 23: Proteolytická aktivita alginátových částic vyjádřená pomocí referenční aktivity

5.7 MTT test cytotoxicity

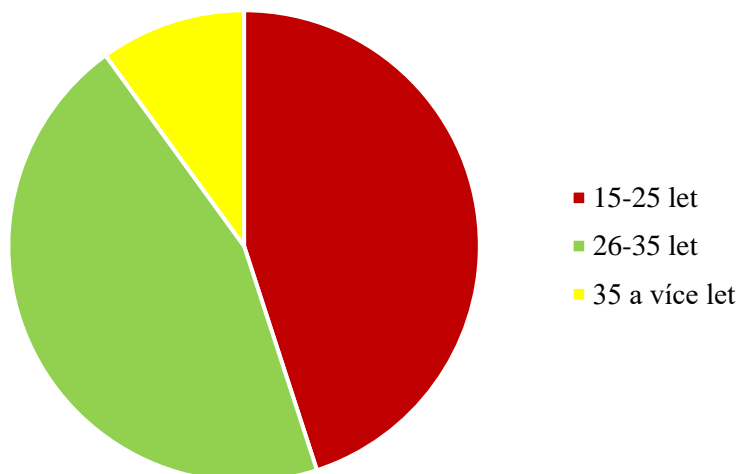
Test cytotoxicity byl proveden na Caco-2 střevních nádorových buňkách podle postupu uvedeného v kapitole 4.13.3. Testovány byly liposomy připravené ze sezamového a kmínového oleje získaného pomocí lisu Yoda, podle postupu v kapitole 4.5.1. Výsledky celého testu jsou vyobrazeny na Obrázek 24. Z grafu je zřejmé, že hranici úhynu nejméně 50 % buněk některé testované liposomy překročily. V případě kmínového oleje se jedná o liposomy o koncentraci oleje 12 obj.% a 14 obj.%. U sezamového oleje úhyn buněk započal již v případě koncentrace 10 obj.%. Dá se tedy říci, že takto získané oleje způsobují ve vyšších koncentracích buněčnou smrt střevních nádorových Caco-2 buněk.



Obrázek 24: Výsledky MTT testu cytotoxicity

5.8 Senzorická analýza

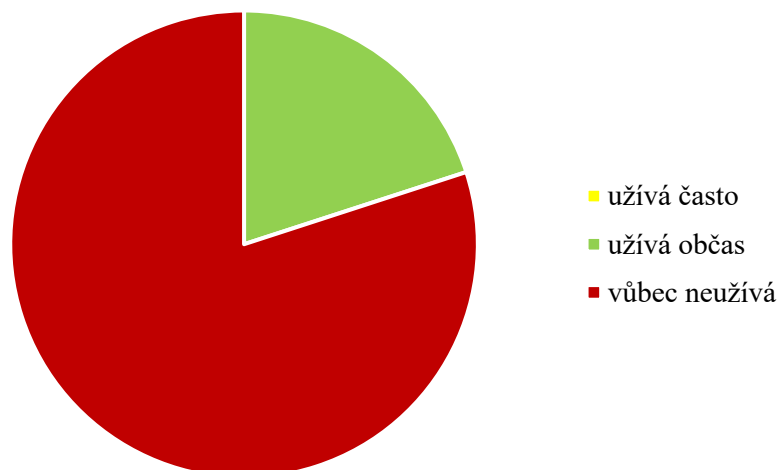
Po optimalizaci základního složení vzorového doplňku stravy, kdy byla jako nejlepší koncentrace alginátu, jakožto nosiče enzymu, zvolena 1% (na základě výsledků modelového trávení) byly připraveny různé typy vzorků. Vzorky připravených čokoládových preparátů hodnotilo 20 hodnotitelů. Jejich věk a stanoviska jsou znázorněna na Obrázek 25, Obrázek 26 a Obrázek 27.



Obrázek 25: Věk hodnotitelů

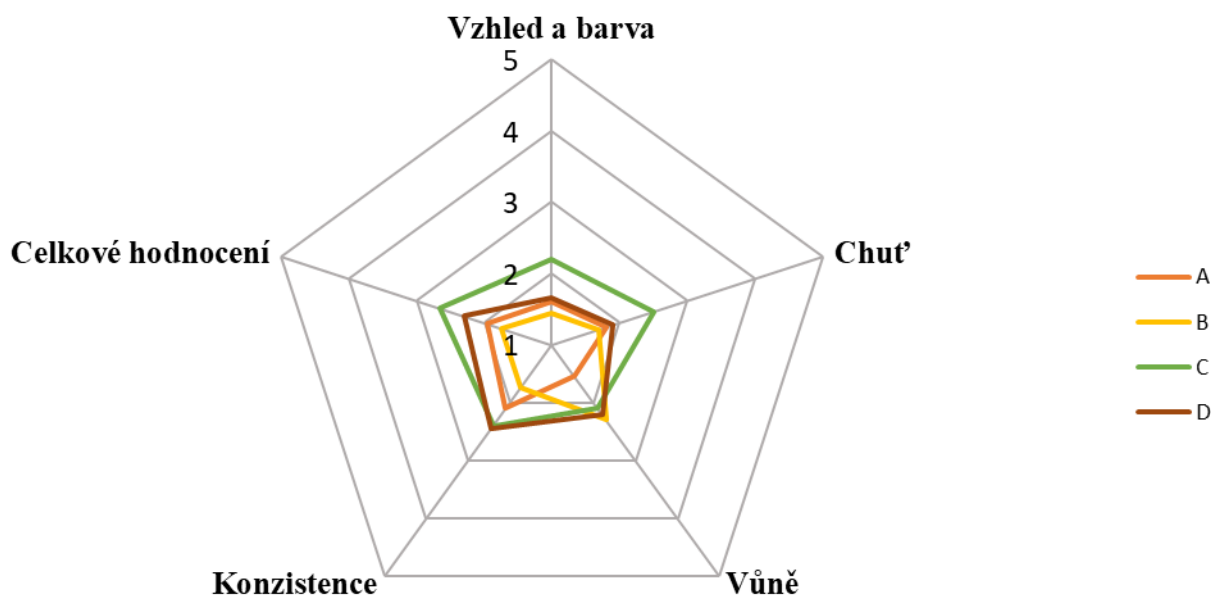


Obrázek 26: Oblíbenost čokoládových cukrovinek



Obrázek 27: Četnost konzumace enzymatických preparátů

Hodnoceny byly celkově čtyři vzorky, jejichž složení je uvedeno v kapitole 4.15.3. V první části senzorické analýzy hodnotící provedli hodnocení čokoládových cukrovinek s obsahem alginátových kuliček stupnicovým testem od 1 do 5 (1 = nejlepší, 5 = nejhorší). Znamky z tohoto hodnocení byly zprůměrovány a jsou znázorněny graficky (viz Obrázek 28) pomocí hvězdčovitého grafu, v němž hodnota 1 značí vzorek jako výborný (v grafu je ve středu hvězdice) a hodnota pět jako nevyhovující (v grafu zaznačena jako okrajová hodnota).



Obrázek 28: Senzorické hodnocení připravených preparátů

Z grafu (Obrázek 28) vyplývá, že z hlediska vzhledu a barvy byl nejlépe hodnocen vzorek B, tedy větší preparát z mléčné čokolády s přidavkem alginátových kuliček s průměrnou známkou 1,45. Na druhém místě se potom s průměrnou známkou 1,60 umístil vzorek A, na třetím místě s průměrnou známkou 1,65 vzorek D a nejhůře byl hodnocen vzorek C

s průměrnou známkou 2,20. Oba nejlépe hodnocené vzorky byly větší čokoládové preparáty, dá se tedy usuzovat, že více čokolády hodnotitelům imponovalo více.

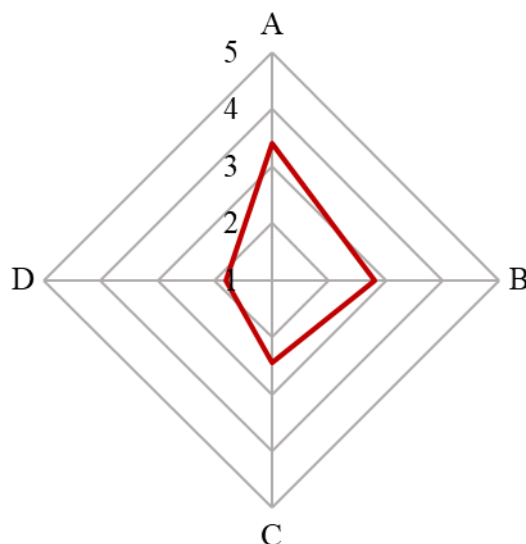
Jako další parametr měli hodnotitelé za úkol známkovat chuť. Nejlépe byl hodnocen vzorek B, stejně jako v případě vzhledu a barvy, s průměrnou známkou 1,7. Na druhém a třetím místě byl poté hodnocen vzorek A s průměrnou známkou 1,8 a vzorek B s průměrným hodnocením 1,9. Stejně jako v případě vzhledu a barvy byl nejhůře hodnocen vzorek C s průměrnou známkou 2,5.

Z hlediska vůně hodnotitelé zvolili jako nejlepší vzorek A s průměrným hodnocením 1,55. Další tři vzorky mají hodnocení podobné, na druhém místě je vzorek C s průměrnou známkou 2,1, na třetím místě vzorek D s průměrným hodnocením 2,2 a na posledním místě vzorek B s průměrným hodnocením 2,3.

Čtvrtým hodnoceným parametrem byla konzistence. U té se na prvním místě umístil vzorek B s průměrným hodnocením 1,75. Na druhém místě se umístil vzorek A a na třetí a čtvrté pozici se umístily vzorky C a D s průměrným hodnocením 2,4 a 2,45.

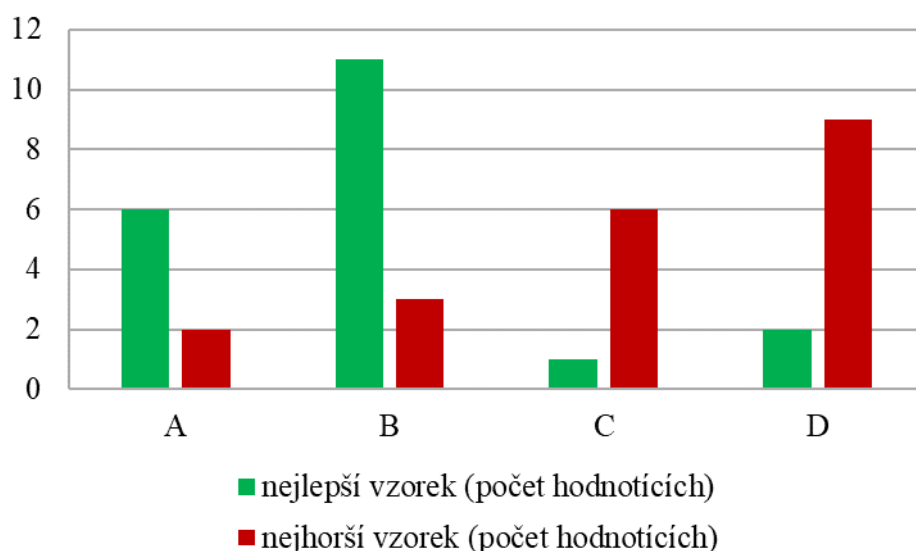
Na závěr měli hodnotitelé provést celkové hodnocení u všech čtyř vzorků. Nejlépe byl hodnocen vzorek B s průměrnou známkou 1,75. Následoval vzorek A s průměrným hodnocením 1,95. Třetím vzorkem je pak vzorek D s průměrným hodnocením 2,3 a nejhůře hodnoceným se stal vzorek C s průměrným hodnocením 2,65.

V další části senzorické analýzy měli hodnotitelé za úkol zaměřit se na konzistenci. Jejich hodnocení lze vidět na Obrázek 29. Na prvním místě se umístil vzorek D s průměrným hodnocením 1,8, tedy menší preparát z mléčné čokolády. Na druhém místě poté následoval vzorek C s průměrným hodnocením 2,45. Na třetí pozici se umístil vzorek B s průměrným hodnocením 2,8 a nejhůře byl hodnocen vzorek A s průměrnou známkou 3,4.



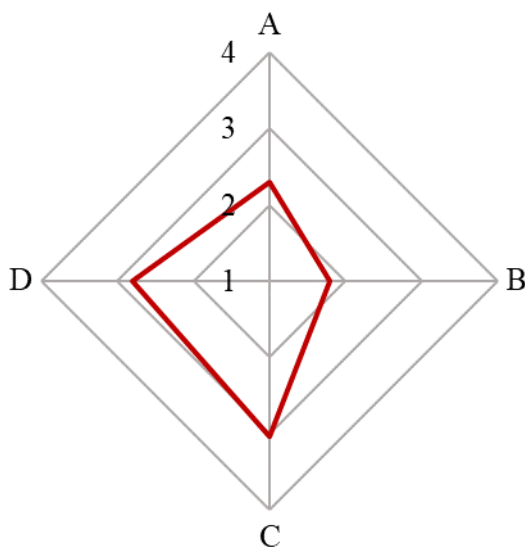
Obrázek 29: Hodnocení konzistence připravených preparátů

Hodnotitelé měli také z hlediska konzistence vybrat nejlepší a nejhorší vzorek. V tomto případě byl jako nejlépe hodnocený vzorek vybrán vzorek B od jedenácti hodnotitelů. Naopak nejhůře byl hodnocen vzorek D, a to od devíti hodnotitelů. Výsledky hodnocení nejlepšího/nejhoršího vzorku jsou patrné z Obrázek 30.



Obrázek 30: Hodnocení nejlepšího a nejhoršího vzorku

Na závěr senzorické analýzy byl hodnotiteli proveden pořadový test (viz Obrázek 31). Zde měli hodnotící seřadit vzorky podle vlastních preferencí. Na první místo umístilo nejvíce hodnotitelů vzorek B vybraný celkem 11 hodnotiteli, naopak nejhůře hodnocen byl vzorek D, který takto ohodnotilo 9 hodnotitelů.



Obrázek 31: Pořadový test připravených preparátů

5.9 Návrh enzymatického doplňku stravy s optimálním složením

Na základě senzorického hodnocení lze považovat jako optimální enzymatický doplněk stravy mléčnou čokoládu větší velikosti s přidavkem 1% alginátových kuliček obsahujících potřebné enzymy, například již dříve zmíněný trypsin, u kterého bylo prokázáno dobré uvolňování z alginátových částic a také dobrá proteolytická aktivita. Do tohoto doplňku by také bylo vhodné přidat liposomové částice připravené ze sezamového nebo kmínového oleje, u kterých byla prokázána výborná antioxidační aktivita a zároveň potenciál pro prevenci vzniku nádorových onemocnění.

Vzhledem k tomu, že je produkt cílen primárně na děti, byl by pro ně atraktivní nejen svým vzhledem (lze využít různých druhů formiček pro přípravu, ať už tvar použitých srdíček, citrusů, medvídků, ale také mnoho dalších, které jsou na trhu k dispozici), ale především použitým materiálem, tedy čokoládou. Při správném dávkování by produkt tedy plnil funkci chutné cukrovinky a zároveň působil blahodárně nejen při prevenci různých onemocnění.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla v první části zaměřena na výběr a charakterizaci některých přírodních látek, především antioxidantů a mastných kyselin a jejich následnou enkapsulaci. Druhá část práce se zabývá optimalizací enzymatického doplňku stravy pro děti. Z tohoto důvodu se teoretická část práce zaměřuje zejména na výživu dětí a složky stravy, které jsou nezbytné pro jejich růst a vývoj, obsahuje ale také problematiku těchto látek v souvislosti s nádorovými onemocněními. Také proběhl screening na trhu dostupných enzymatických přípravků.

V první části experimentální práce byly nejdříve různými metodami získávány oleje ze čtyř různých druhů semínek, a to metodou extrakce i lisováním zastudena, přičemž z hlediska kvantitativního získávání olejů jednoznačně převažuje metoda lisováním zastudena. Následně byla u takto získaných olejů provedena řada analýz. Nejprve byl stanoven profil mastných kyselin nejen ve všech olejích, ale také v pevných vzorcích, tedy v samotných semínkách a v pokrutinách, které zbyly po lisování zastudena. V případě pevných vzorků byl nejvyšší obsah mastných kyselin prokázán v případě dýňových semínek po extrakci na Soxthermu a to v množství 280,59 mg/g. V případě olejů byl nejvyšší obsah mastných kyselin stanoven u oleje získaného ze sezamových pokrutin v množství 979,96 mg/g, ale také u oleje získaného extrakcí Soxthermem ze sezamových semínek v množství 893,90 mg/g. Procentuální zastoupení nenasycených mastných kyselin bylo ve všech případech mnohem vyšší než zastoupení nasycených mastných kyselin, ve většině případů také převládá množství polynenasycených mastných kyselin nad mononenasycenými mastnými kyselinami. Nejvíce polynenasycených mastných kyselin se u pevných vzorků vyskytuje u kmínu po extrakci na Soxthermu, u něhož zároveň nebyl prokázán žádný obsah mononenasycených mastných kyselin. V případě olejů se nejvyšší podíl polynenasycených mastných kyselin vyskytuje u oleje extrahovaného z lněných pokrutin na Soxthermu. Poté byla stanovena antioxidační aktivita, fenolické sloučeniny, flavonoidy, karotenoidy a chlorofyly. Nejvyšší koncentrace fenolických sloučenin byla stanovena v případě sezamového oleje získaného extrakcí, konkrétně $8,856 \pm 0,829$ mg/g. U flavonoidů byla zjištěna nejvyšší koncentrace u stejného oleje, jako v případě fenolických sloučenin a činila $12,999 \pm 1,537$ mg/g. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena v případě kmínového oleje, který byl získán lisováním zastudena. Činila $370 \pm 1,179$ mg/g. Nejvyšší obsah karotenoidů byl prokázán v případě dýňových semínek, a to $71,316 \pm 0,670$ µg/g. Stejně tak tomu bylo i v případě dýně, u které byl potvrzen nejvyšší obsah chlorofylu a i b. Celkový obsah chlorofylů u dýňových semínek tedy činil $71,463 \pm 0,542$ µg/g.

Na základě všech těchto analýz a vyhodnocení byly v následující části práce vybrány dva oleje, ze kterých byly připraveny liposomy, a to kmínový a sezamový, oba získané lisováním zastudena. Tyto liposomy byly dále použity pro testy cytotoxicity na humánních střevních nádorových buňkách Caco-2. Při použití liposomů o koncentracích 12 obj.% a 14 obj.% kmínového oleje docházelo k úhynu nejméně 50 % buněk a v případě sezamového oleje k úhynu docházelo již v případě 10 obj.%.

Dále proběhlo modelové trávení, ve kterém byla ověřena stabilita alginátových částic jakožto nosičů trávicích enzymů. Na základě výsledků byly jako ideální nosiče zvoleny 1% alginátové částice, díky kterým se budou enzymy v trávicím traktu dostatečně uvolňovat, aby

splnily svůj účel a podpořily trávení. Nejlépe se uvolnil po modelovém trávení trypsin, a to v množství 45,70 %, kdy zároveň vykazoval nejvyšší proteolytickou aktivitu, tedy 92,82 % referenční aktivity.

Další část práce byla zaměřena na vývoj enzymatického doplňku stravy určeného pro děti. Jako nosiče enzymů byly zvoleny alginátové částice o koncentracích 1 % a 1,5 %. Jako materiál, který tvořil podstatnou část navrhovaného doplňku stravy, byla zvolena mléčná a hořká čokoláda, právě kvůli oblíbenosti a atraktivitě mezi mladými konzumenty.

Takto připravené enzymatické doplňky stravy byly podrobeny senzorické analýze, které se účastnili zkušební hodnotitelé. Ti měli za úkol hodnotit vzhled, chuť i konzistenci. Vzhledově nejlépe byl hodnocen větší vzorek z mléčné čokolády s průměrnou známkou 1,45, naopak nejhůře na tom byl menší vzorek z hořké čokolády hodnocený průměrnou známkou 2,20. Podobně tak tomu bylo i v případě chuti. Na základě konzistence byl jako nejlepší vzorek hodnotiteli vybrán menší vzorek z mléčné čokolády s průměrným hodnocením 1,8, naopak nejhůře se umístil větší vzorek z hořké čokolády s průměrnou známkou 3,4. I na základě pořadového testu bylo vyhodnoceno, že nejlepším vzorkem byl právě větší vzorek připravený z mléčné čokolády s průměrnou známkou 1,75, oproti tomu nejhorším vzorkem byl malý vzorek, taktéž z mléčné čokolády o průměrném hodnocení 2,65. Dá se tedy říci, že jako optimální návrh doplňku stravy se jeví vzorek připravený z většího množství mléčné čokolády obsahující 1% alginátové částice jako nosiče enzymu trypsinu. Zároveň je možné připravený enzymový preparát obohatit přídavkem liposomů ze sezamového nebo kmínového oleje, u nichž byla prokázána výborná antioxidační aktivita a navýšit tak zdravotní benefity připraveného doplňku stravy.

7 BIBLIOGRAFIE

- (1) NEVORAL, Jiří. *Praktická pediatrická gastroenterologie, hepatologie a výživa*. Praha: Mladá fronta, 2013. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-802-0428-639.
- (2) MARIEB, Elaine a Jon MALLATT. *Anatomie lidského těla*. 3. Brno: CP Books, 2005. ISBN 80-251-0066-9.
- (3) KLIMEŠOVÁ, Iva a Jiří STELZER. *Fyziologie výživy*. 1. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. ISBN 978-802-4432-809.
- (4) NAŇKA, Ondřej a Miloslava ELIŠKOVÁ. *Přehled anatomie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-807-4922-060.
- (5) DYLEVSKÝ, Ivan. *Somatologie: pro předmět Základy anatomie a fyziologie člověka*. 3. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-271-2111-3.
- (6) VINCENTOVÁ, Dana. Výživa novorozence, kojence a batolete. *Pediatric pro praxi*. 2006, (4), 224-226.
- (7) FRŮHAUF, Pavel. Tuky v dětské výživě. *Pediatric pro praxi* [online]. 2007, **8**(5), 256-258 [cit. 2020-01-11]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2007/05/01.pdf>
- (8) RUSKOVÁ, Jitka. Tuky v prevenci nemocí srdce a cév u dětí. *Pediatric pro praxi* [online]. 2011, **12**(1), 48-50 [cit. 2020-01-11]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2011/01/12.pdf>
- (9) Ateroskleróza – Nemoc cév | NICM. *NICM | Národní informační centrum pro mládež* [online]. Praha: Národní informační centrum pro mládež, 2013 [cit. 2020-01-13]. Dostupné z: <http://www.nicm.cz/ateroskleroz-a-nemoc-cev>
- (10) VYHNÁNKOVÁ, Ludmila. Význam PUFA OMEGA-3 pro děti. *Pediatric pro praxi*. 2010, **11**(5), 336–338.
- (11) CHALON, Sylvie. The role of fatty acids in the treatment of ADHD. *Neuropharmacology* [online]. 2009, **57**(7-8), 636-639 [cit. 2020-06-25]. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.08.012. ISSN 00283908. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390809002809>
- (12) VYHNÁNKOVÁ, Ludmila. PUFA OMEGA-3 A JEJICH PŮSOBENÍ. *Pediatric pro praxi*. 2007, **8**(3), 140–143.
- (13) REN, Guan-Yu, Chun-Yang CHEN, Guo-Chong CHEN et al. Effect of Flaxseed Intervention on Inflammatory Marker C-Reactive Protein: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* [online]. 2016, **8**(3) [cit. 2020-06-07]. DOI: 10.3390/nu8030136. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/3/136>
- (14) BAYRAK, A., M. KIRALAN, A. IPEK, N. ARSLAN, B. COSGE a K.M. KHAWAR. *Fatty Acid Compositions of Linseed (Linum Usitatissimum L.) Genotypes of Different Origin Cultivated in Turkey* [online]. 2014, **24**(2), 1836-1842 [cit. 2020-06-07]. DOI:

10.2478/V10133-010-0034-2. ISSN 1310-2818. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2478/V10133-010-0034-2>

- (15) HUFFMAN, Sandra, Rajwinder HARIKA, Ans EILANDER a Saskia OSENDARP. *Essential fats: how do they affect growth and development of infants and young children in developing countries? A literature review* [online]. 2011, **7**, 44-65 [cit. 2020-06-07]. DOI: 10.1111/j.1740-8709.2011.00356.x. ISSN 17408695. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1740-8709.2011.00356.x>
- (16) CHAM, Bill, Jeffery SMITH a David COLQUHOUN. Correlations between Cholesterol, Vitamin E, and Vitamin K1 in Serum: Paradoxical Relationships to Established Epidemiological Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Clinical Chemistry* [online]. 1998, **44**(8), 1753-1755 [cit. 2020-06-07]. DOI: 10.1093/clinchem/44.8.1753. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/44/8/1753/5642890>
- (17) Analysis of the fatty acids contained in sesame oil (*Sesamum indicum*). *Essential oils South Africa and World for Aromatherapy* [online]. Cape Town: Sallamander Concepts, c1998–2020 [cit. 2020-06-07]. Dostupné z: <https://essentialoils.co.za/sesame-oil-analysis.htm>
- (18) CHO, Young, Sang LEE, Dong JEONG, Eun CHOI, Yun KIM, Jeong LEE, Yu YI a Hyeong CHA. Effect of Pumpkin Seed Oil on Hair Growth in Men with Androgenetic Alopecia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2014, **2014**, 1-7 [cit. 2020-06-07]. DOI: 10.1155/2014/549721. ISSN 1741-427X. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/549721/>
- (19) Cumin|Definition, Uses & Facts|Britannica.com. <https://www.britannica.com/> [online]. Encyclopædia Britannica, Inc., 2020 [cit. 2020-06-07]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/plant/cumin>
- (20) Oil and Oilseed Processing | Oklahoma State University. *OSU Extension - Home / Oklahoma State University* [online]. Oklahoma: Oklahoma State University, 2020 [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: <https://extension.okstate.edu/fact-sheets/oil-and-oilseed-processing-i.html>
- (21) O olejích | Brno Vom Fass. *Brno – Vom Fass* [online]. Brno: Vom Fass, 2020 [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: <http://www.brnovomfass.cz/produkty/oleje/o-olejich/>
- (22) Oilseed Presses. *Penn State Extension* [online]. Pennsylvania: College of Agricultural Sciences, 2020 [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: <https://extension.psu.edu/oilseed-presses>
- (23) JIMRAMOVSKÝ, Tomáš. Vitaminy a stopové prvky u novorozenců. *Pediatric pro praxi*. 2018, **19**(5), 256–261.
- (24) PAVEL, Frühauf. Mateřské mléko a jeho biologické aktivity. *Pediatric pro praxi* [online]. 2013, **14**(1), 63-64 [cit. 2020-01-11]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2013/01/18.pdf>
- (25) VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-802-0006-004.
- (26) SÝKORA, Josef. *Onemocnění žaludku a dvanáctníku v dětském věku*. Vydání 1. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4212-5.

- (27) NEVORAL, Jiří. Jsou potravinové doplňky pro děti vždy prospěšné?. *Pediatric pro praxi* [online]. 2018, **19**(2), 103-106 [cit. 2020-01-11]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2018/02/08.pdf>
- (28) Nejen nemoci pankreatu a jejich terapie pankreatickými enzymy. *Interní medicína pro praxi*. 2015, **17**(5), 227-229.
- (29) ZUIDAM, N.J. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. New York, NY: Springer New York, 2010. ISBN 978-144-1910-080.
- (30) OLÍMPIO, Fernanda, Adriano MENDES, Marcello TREVISAN a Jerusa GARCIA. Preparation and Delayed Release Study on Pancreatin Encapsulated into Alginate, Carrageenan and Pectin Hydrogels. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2020. DOI: 10.21577/0103-5053.20190184. ISSN 01035053.
- (31) DESAI, Kashappa a Hyun JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*. 2005, **23**(7), 1361-1394. DOI: 10.1081/DRT-200063478. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478>
- (32) RISCH, Sara. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. Washington, DC: American Chemical Society, 1995, , 2-7. ACS Symposium Series. DOI: 10.1021/bk-1995-0590.ch001. ISBN 0-8412-3164-8. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1995-0590.ch001>
- (33) BAJEROVÁ, M, K DVOŘÁČKOVÁ, J GAJDZIOK, R MASTEIKOVÁ a M RABIŠKOVÁ. Metody přípravy mikročástic ve farmaceutické technologii. *Česká a slovenská farmacie*. 2009, **58**(5-6), 191-199.
- (34) DIMA, Ștefan, Cristian DIMA a Gabriela IORDĂCHESCU. Encapsulation of Functional Lipophilic Food and Drug Biocomponents. *Food Engineering Reviews*. 2015, **7**(4), 417-438. DOI: 10.1007/s12393-015-9115-1. ISSN 1866-7910. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12393-015-9115-1>
- (35) ARNDT, Tomáš. Trávicí enzymy. *Celostnimedica.cz | Informační server o zdraví* [online]. Chrudim: Rozhoň, c2001–2020 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/travici-enzymy.htm>
- (36) Pancreatin for pancreatic insufficiency. *Medicines for Children* [online]. London: Medicines for Children [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://www.medicinesforchildren.org.uk/pancreatin-pancreatic-insufficiency>
- (37) NANO, Jean-Louis, Christine NOBILI, Fernand GIRARD-PIPAU a Patrick RAMPAL. Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2003, **69**(4), 207-215. DOI: 10.1016/S0952-3278(03)00083-8. ISSN 09523278. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327803000838>
- (38) NARAYANI, S., S. SARAVANAN, J. RAVINDRAN, M.S. RAMASAMY a J. CHITRA. In vitro anticancer activity of fucoidan extracted from *Sargassum cinereum* against Caco-2 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, **138**(3), 618-628. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.127. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019321683>

- (39) CILLA, Antonio, Antonio GONZÁLEZ-SARRÍAS, Francisco TOMÁS-BARBERÁN, Juan ESPÍN a Reyes BARBERÁ. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*. 2009, **114**(3), 813-820. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.10.019. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460801234X>
- (40) STĘPNIK, Katarzyna, Irena MALINOWSKA a Edward RÓJ. In vitro and in silico determination of oral, jejunal and Caco-2 human absorption of fatty acids and polyphenols. Micellar liquid chromatography. *Talanta*. 2014, **130**, 265-273. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.06.039. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914014004950>
- (41) GARRETT, Dean, Mark FAILLA a Robert SARAMA. Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2000, **11**(11-12), 574-580. DOI: 10.1016/S0955-2863(00)00122-4. ISSN 09552863. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286300001224>
- (42) JUAN-GARCÍA, Ana, Domenico MONTESANO, Jordi MAÑES a Cristina JUAN. Cytoprotective effects of carotenoids-rich extract from *Lycium barbarum* L. on the beauvericin-induced cytotoxicity on Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, **133**. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110798. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691519305885>
- (43) NISHINO, Hoyoku, Michiaki MURAKOSHI, Harukuni TOKUDA a Yoshiko SATOMI. Cancer prevention by carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2009, **483**(2), 165-168. DOI: 10.1016/j.abb.2008.09.011. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986108004487>
- (44) ROCA, María. In vitro digestive stability and uptake by Caco-2 human intestinal cells of nonfluorescent chlorophyll catabolites. *Food Chemistry*. 2012, **130**(1), 134-138. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.016. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611009630>
- (45) CHEN, Kewei a María ROCA. In vitro bioavailability of chlorophyll pigments from edible seaweeds. *Journal of Functional Foods*. 2018, **41**, 25-33. DOI: 10.1016/j.jff.2017.12.029. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464617307508>
- (46) FIRÁKOVÁ, SILVIA, ANDREJ JEDINÁK, TIBOR MALIAR a ERNEST ŠTURDÍK. Kvantitatívne vzťahy medzi štruktúrou a schopnosťou flavonoidov redukovať železitý komplex. *Chemické listy*. 2006, **100**(11), 980-986.
- (47) ROTELLI, A. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*. 2003, **48**(6), 601-606. DOI: 10.1016/S1043-6618(03)00225-1. ISSN 10436618. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661803002251>
- (48) *Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca*. 4. Praha: Avicenum, 1987.
- (49) MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *Praktikum z biochemie*. Ústav chemie potravin a biotechnológií FCH VUT v Brně: Fakulta chemická VUT v Brně, 2002.

- (50) DENKIN, Steven M. a David R. NELSON. Induction of Protease Activity in *Vibrio anguillarum* by Gastrointestinal Mucus. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, **65**(8), 3555-3560. DOI: 10.1128/AEM.65.8.3555-3560.1999. ISSN 1098-5336. Dostupné také z: <https://AEM.asm.org/content/65/8/3555>
- (51) MORITA, Y., Q. HASAN, T. SAKAGUCHI, Y. MURAKAMI, K. YOKOYAMA a E. TAMIYA. Properties of a cold-active protease from psychrotrophic *Flavobacterium balustinum* P104. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998, **50**(6), 669-675. DOI: 10.1007/s002530051349. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051349>
- (52) OLIVE POMACE OIL. *OLIVE POMACE OIL* [online]. ORIVA, 2018 [cit. 2020-06-29]. Dostupné z: <https://oriva.es/en/olive-pomace-oil/>
- (53) EL-GHORAB, Ahmed Hassan, Muhammad NAUMAN, Faqir Muhammad ANJUM, Shahzad HUSSAIN a Muhammad NADEEM. A Comparative Study on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Ginger (*Zingiber officinale*) and Cumin (*Cuminum cyminum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(14), 8231-8237 [cit. 2020-06-28]. DOI: 10.1021/jf101202x. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf101202x>

8 SEZNAM ZKRATEK

EPA – Eikosapentaenová kyselina

DHA – Dokosahexaenová kyselina

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

DMSO – Dimethylsulfoxid

ADHD – Attention Deficit Hyperactivity Disorder

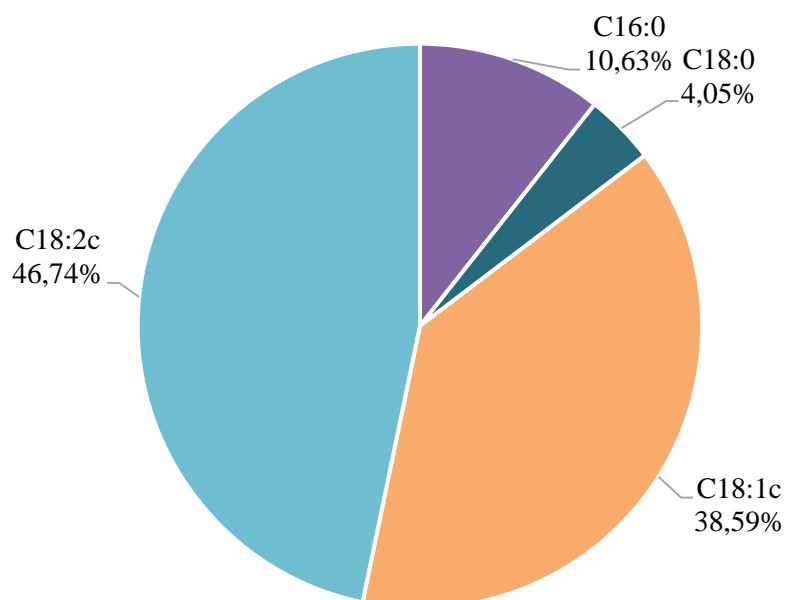
PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids (polynenasycené mastné kyseliny)

MUFA – Monounsaturated Fatty Acids (mononenasycené mastné kyseliny)

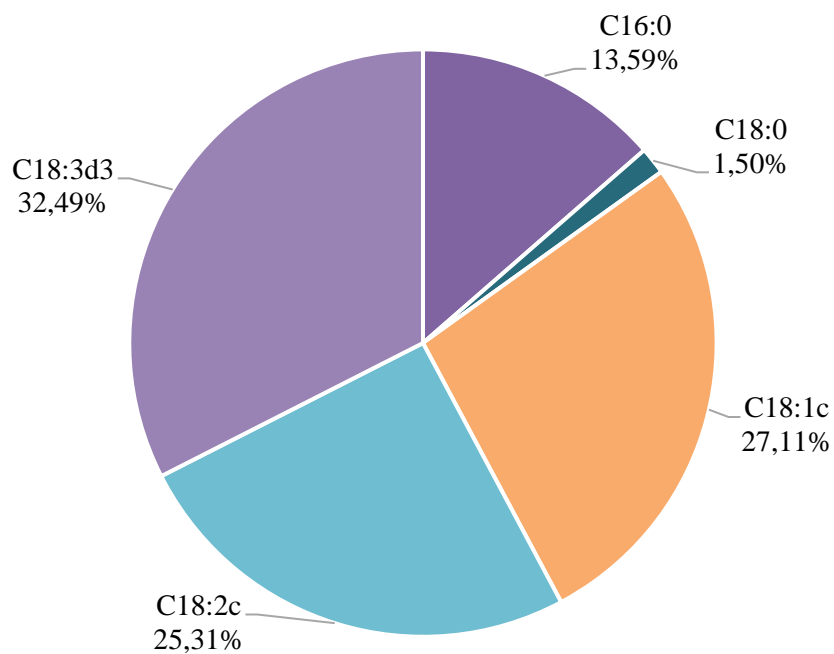
9 PŘÍLOHY

Příloha 1 – Přehled mastných kyselin v biomase a olejích

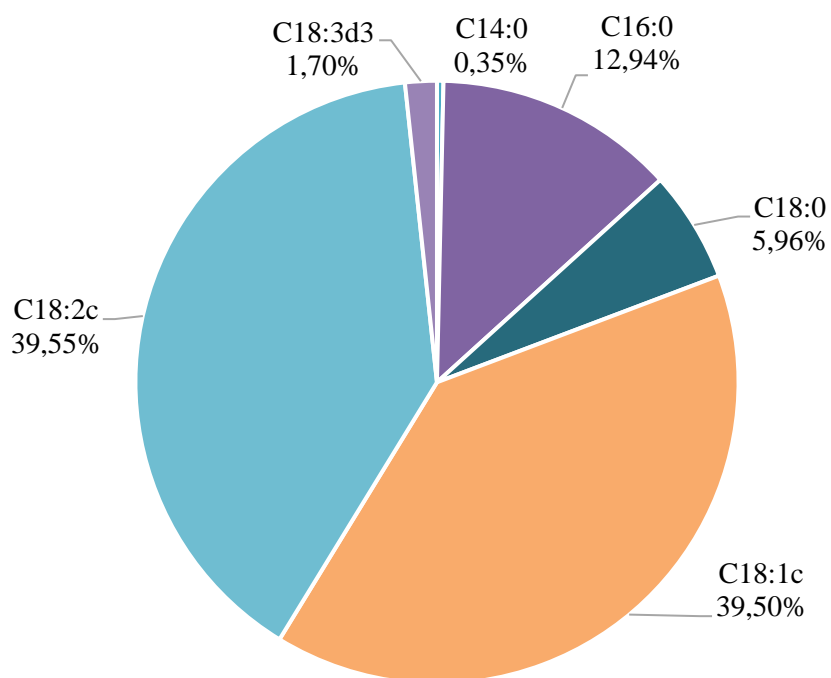
- Analýza profilu mastných kyselin u biomasy



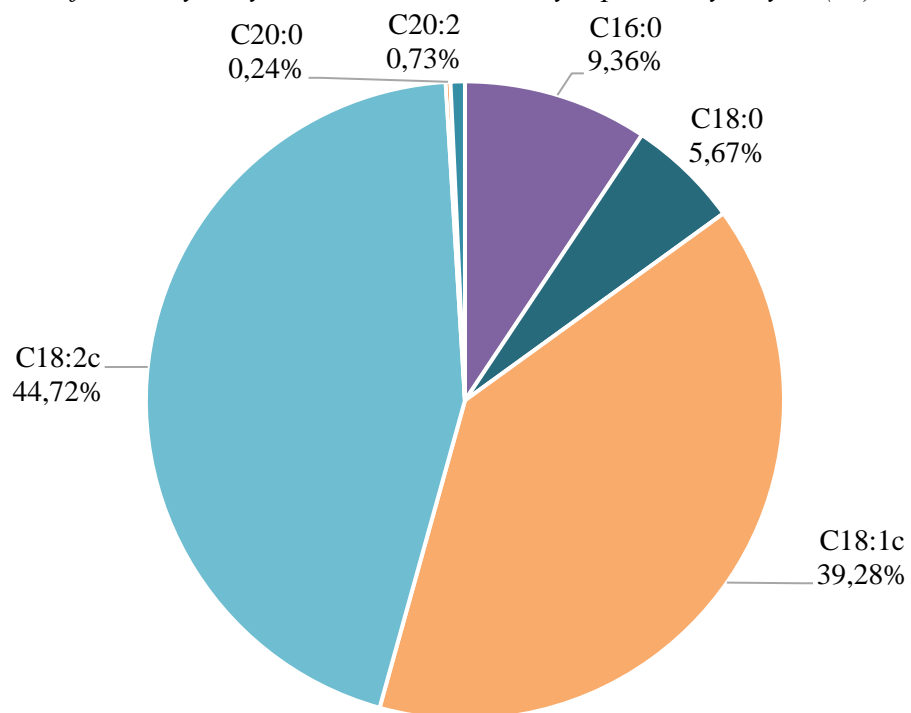
Obrázek 32: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – sezamové semínko (S1)



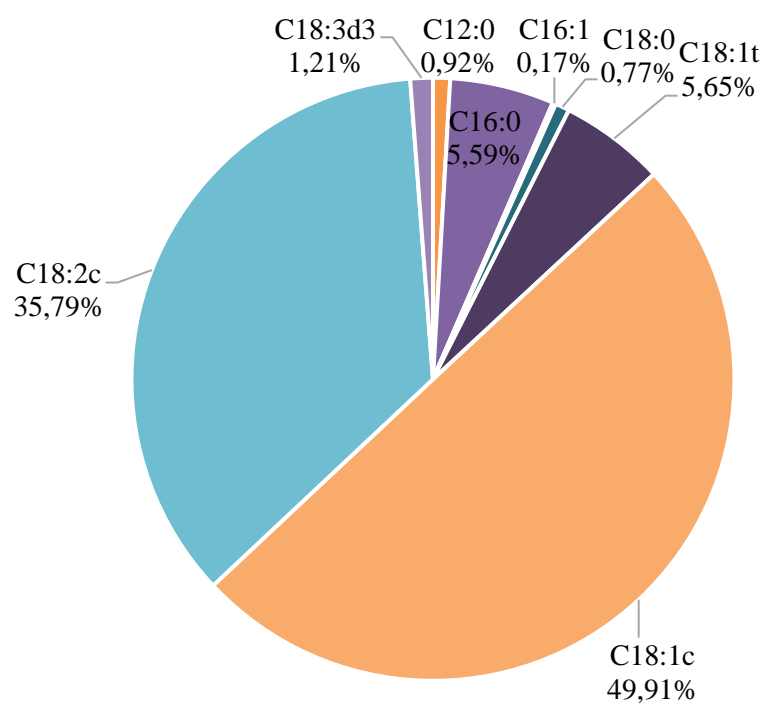
Obrázek 33: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – pokrutiny ze lnu (S2)



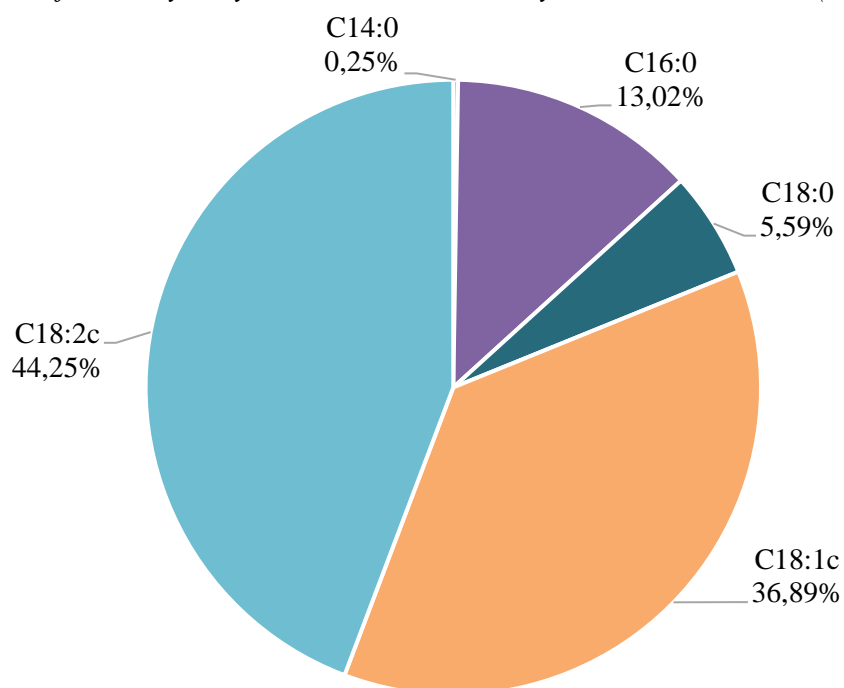
Obrázek 34: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – pokrutiny z dýně (S3)



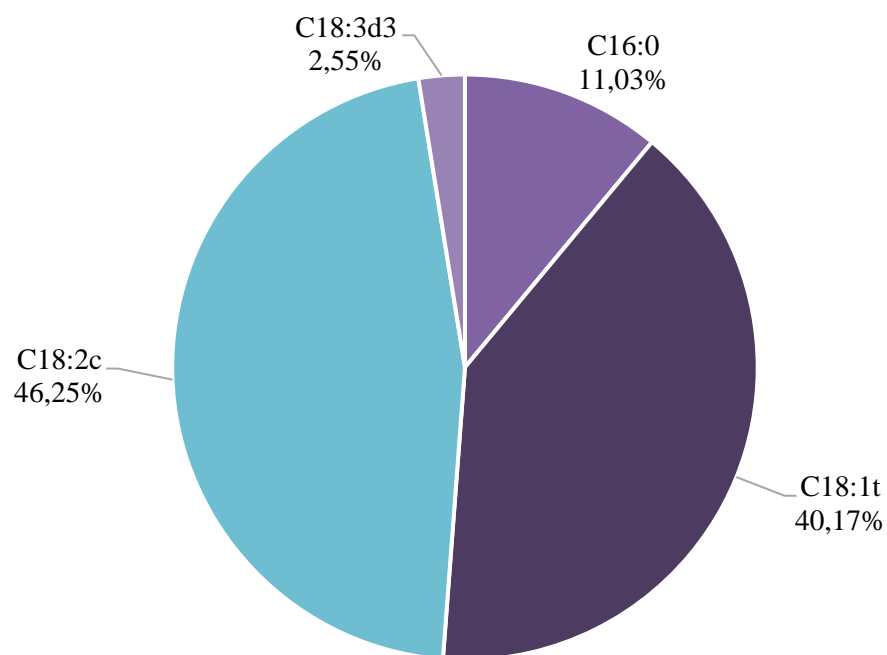
Obrázek 35: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – pokrutiny ze sezamu (S4)



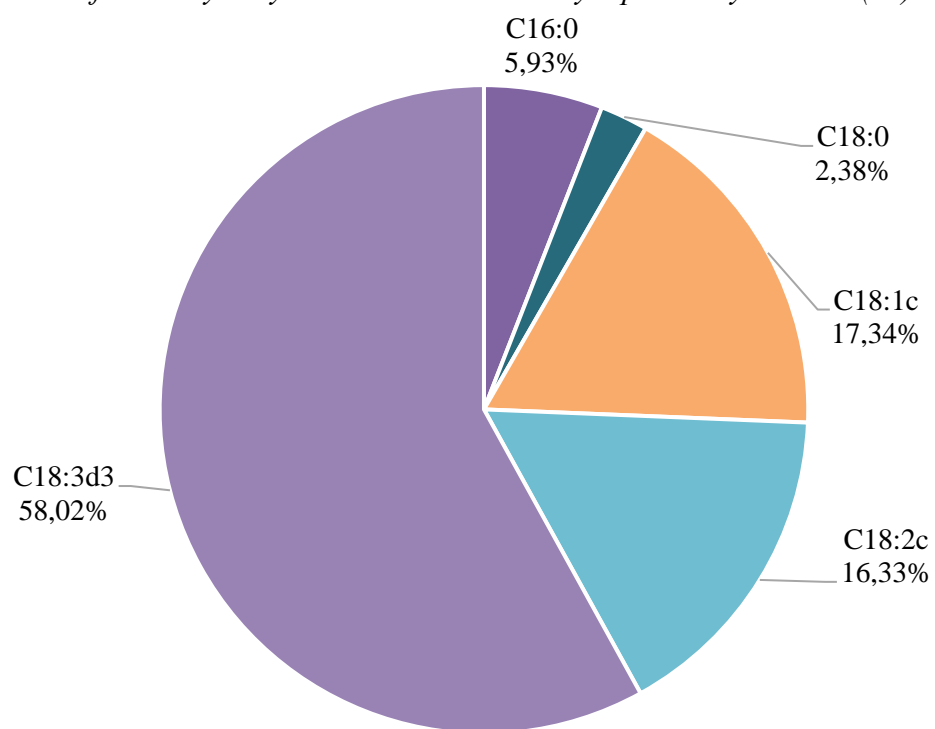
Obrázek 36: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – kmínové semínko (S5)



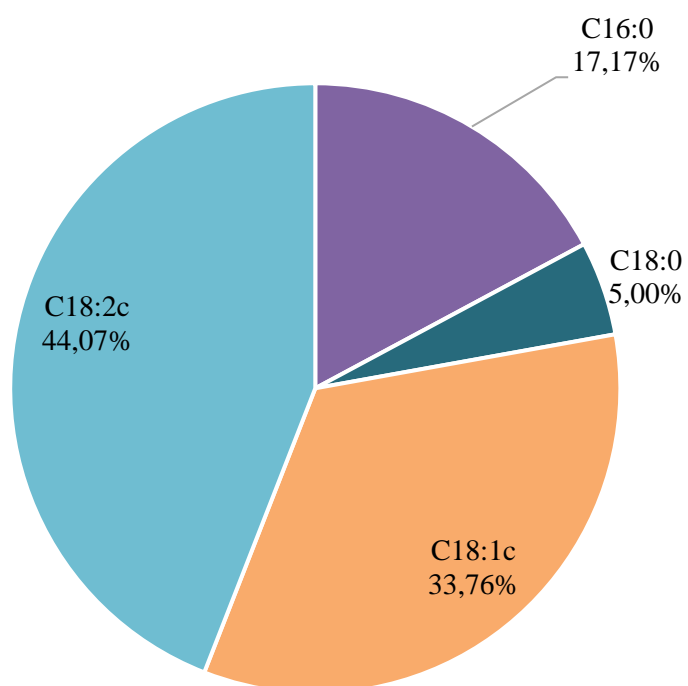
Obrázek 37: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – dýňové semínko (S6)



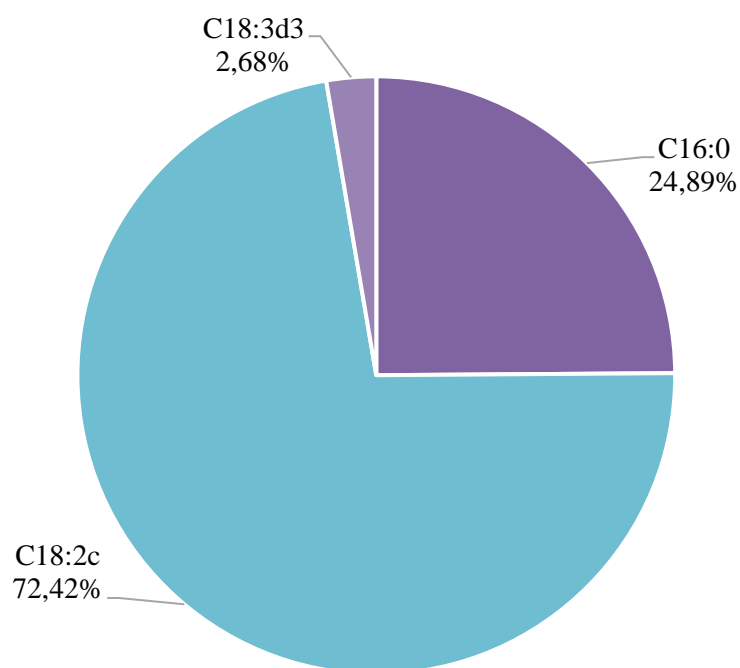
Obrázek 38: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – pokrutiny z kmínu (S7)



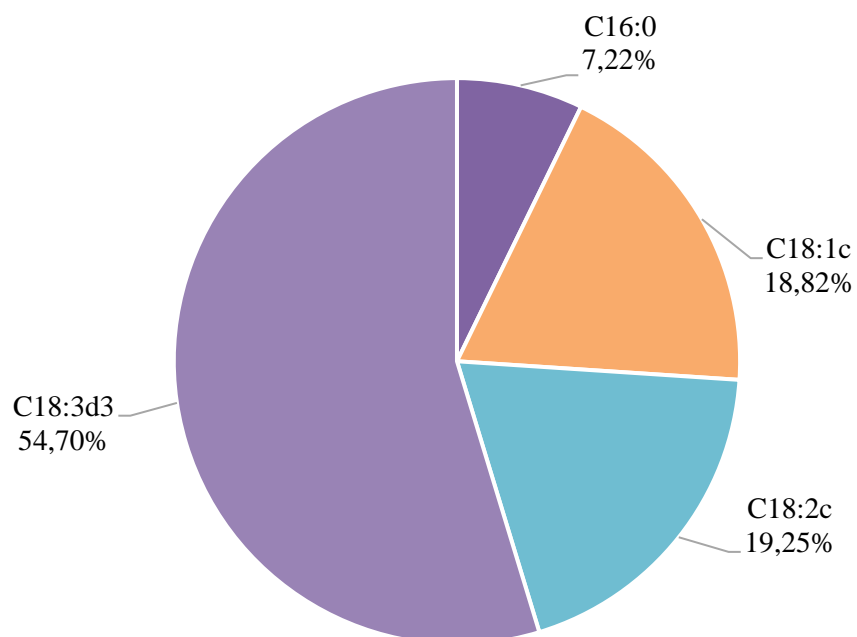
Obrázek 39: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – lněné semínko (S8)



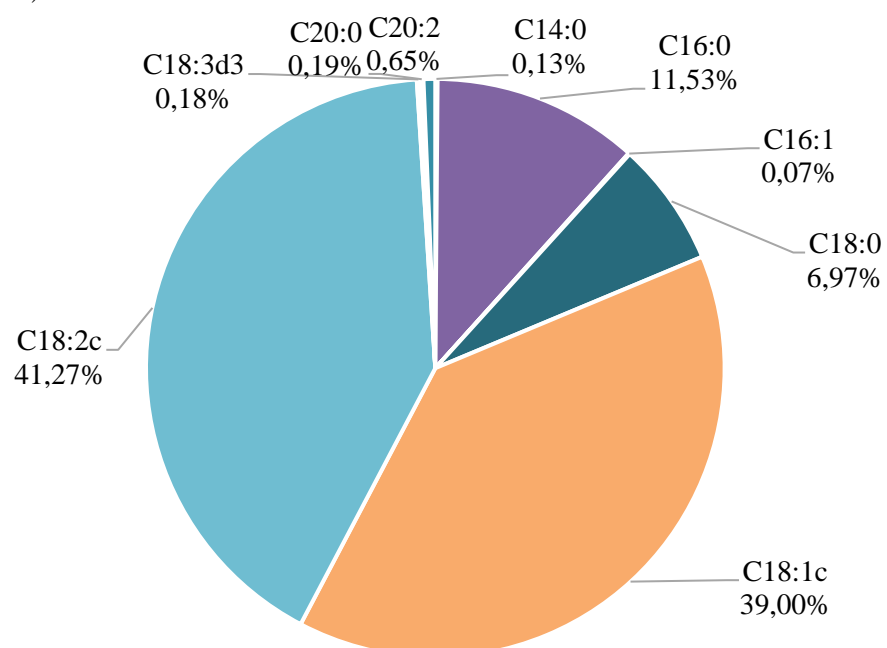
Obrázek 40: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – sezamová semínka po extrakci na Soxthermu (S9)



Obrázek 41: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – kmínová semínka po extrakci na Soxthermu (S10)

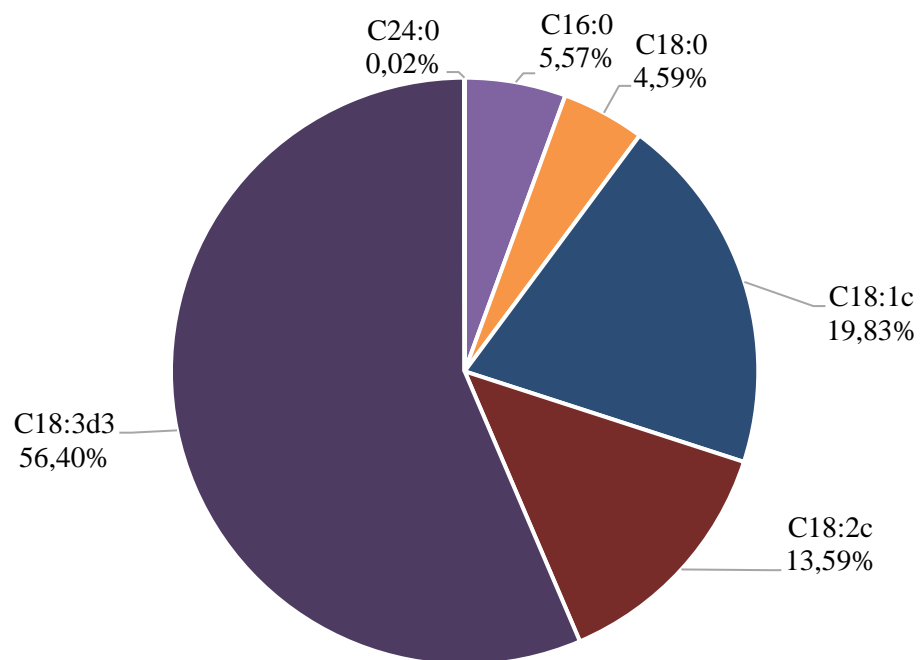


Obrázek 42: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – lněná semínka po extrakci na Soxthermu (S11)

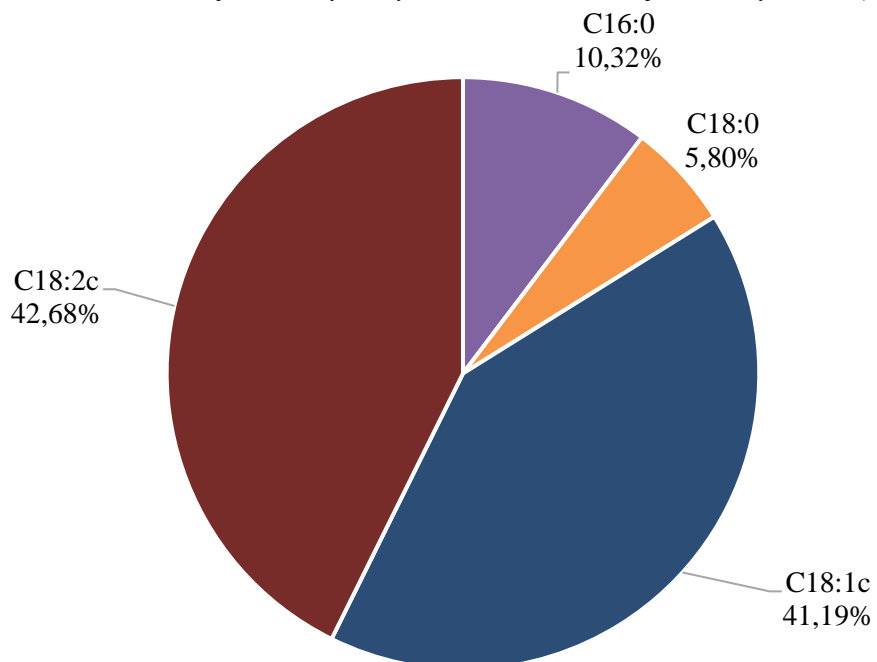


Obrázek 43: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – dýňová semínka po extrakci na Soxthermu (S12)

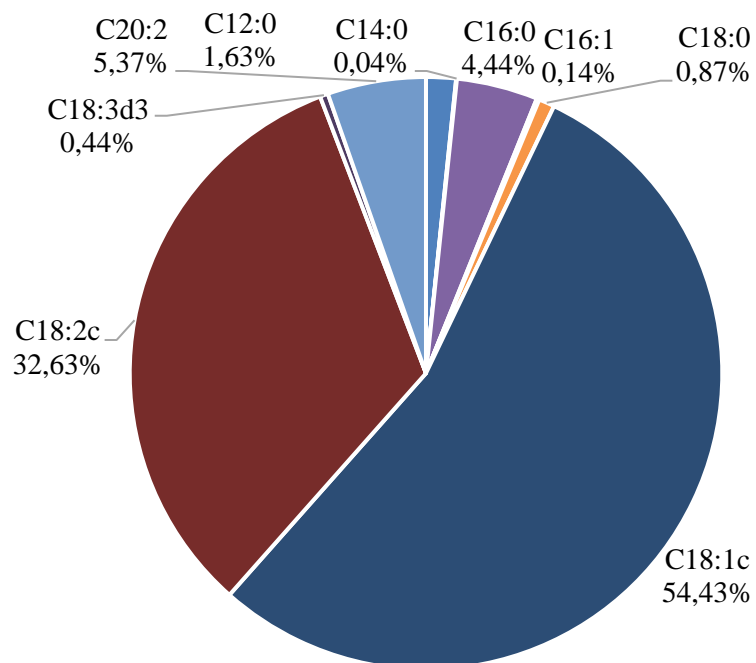
- Analýza profilu mastných kyselin u olejů



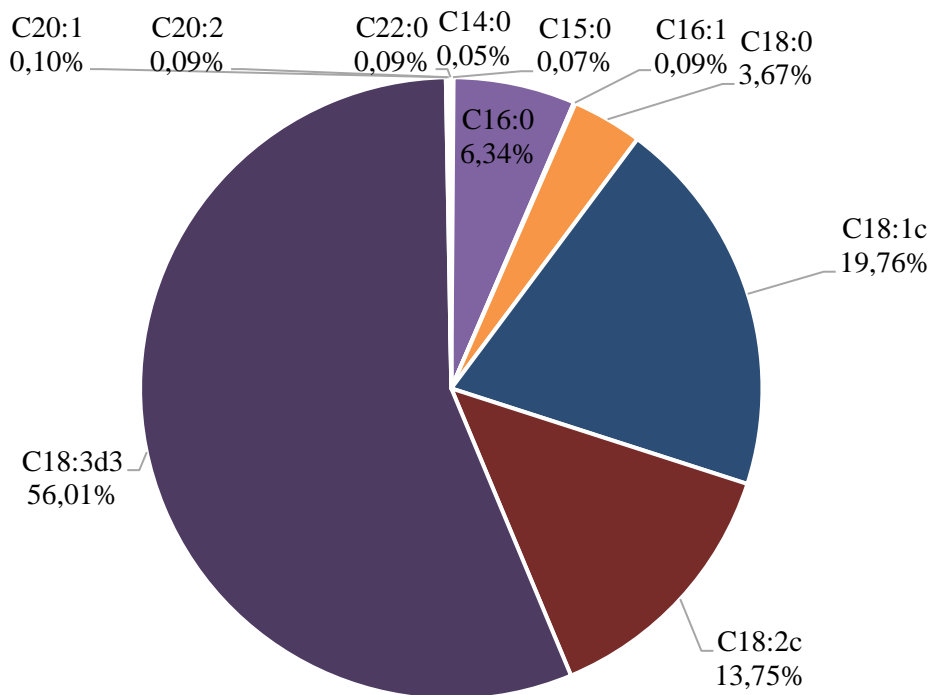
Obrázek 44: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – lněný z lisu (O1)



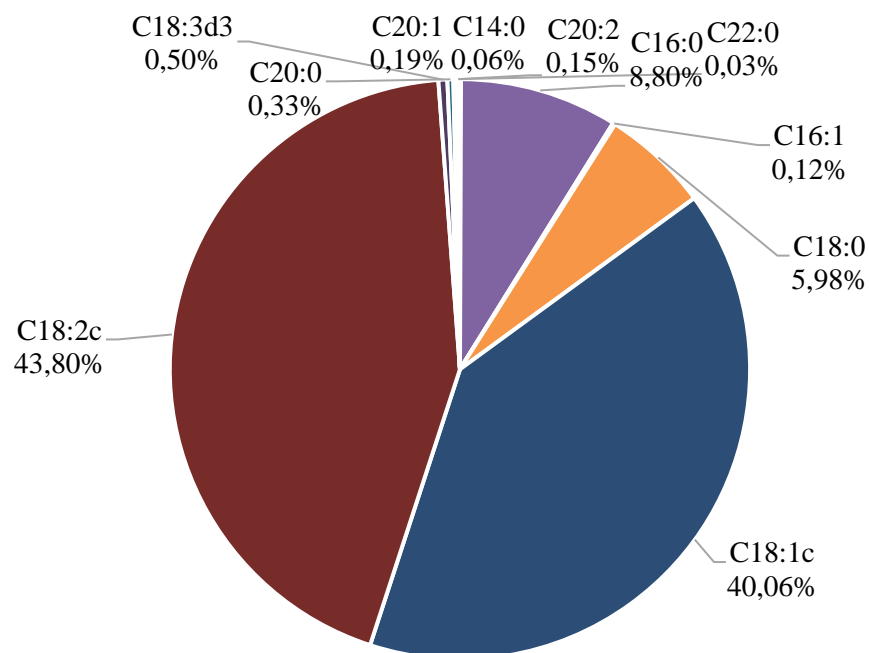
Obrázek 45: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – sezamový z lisu (O2)



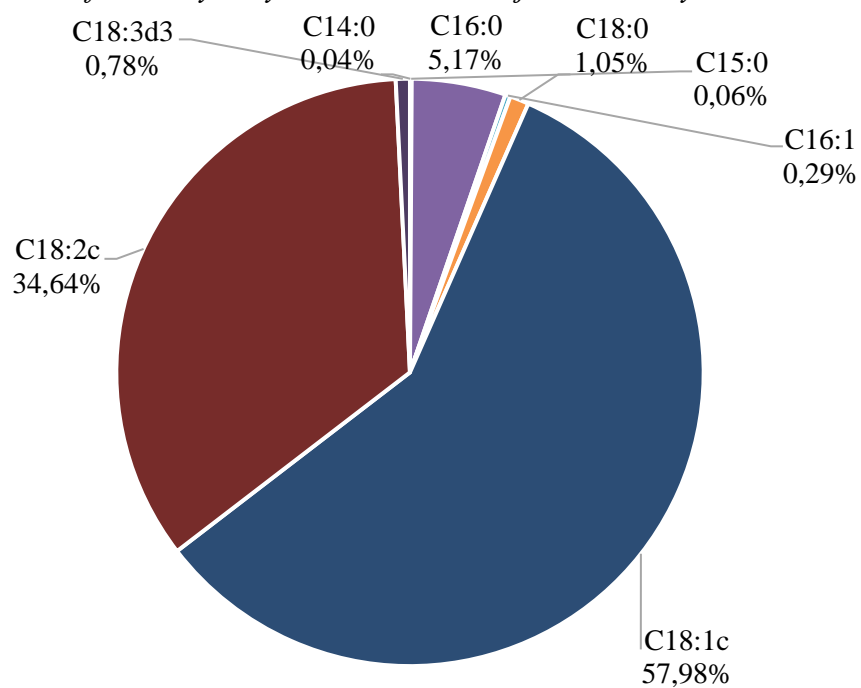
Obrázek 46: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – kmínový z lisu (O3)



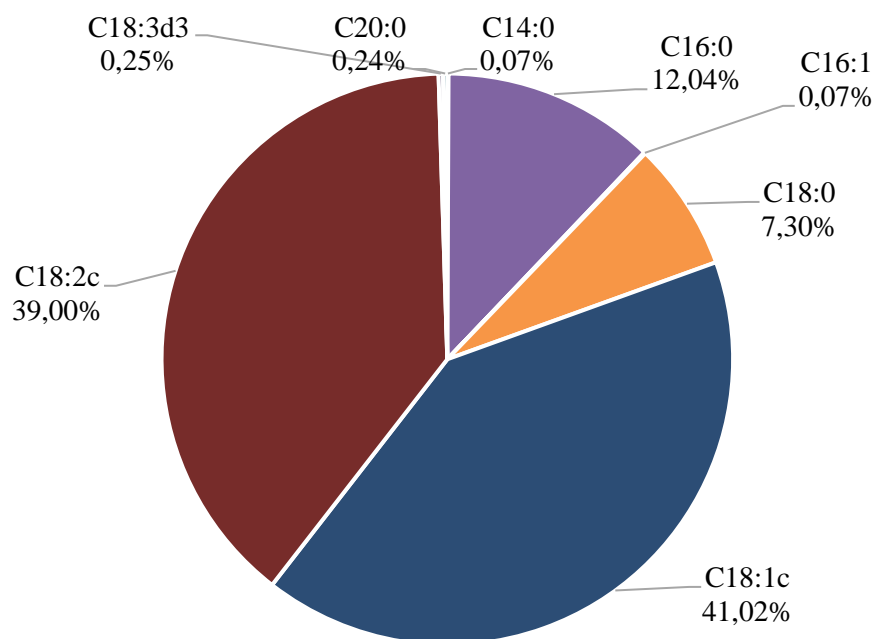
Obrázek 47: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – lněný ze Soxthermu (O4)



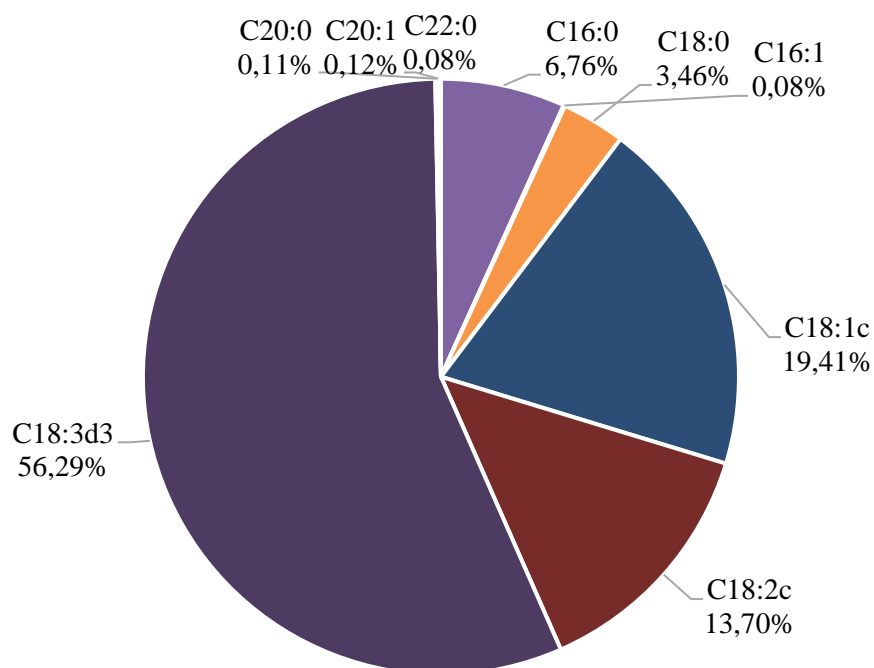
Obrázek 48: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – sezamový ze Soxthermu (O5)



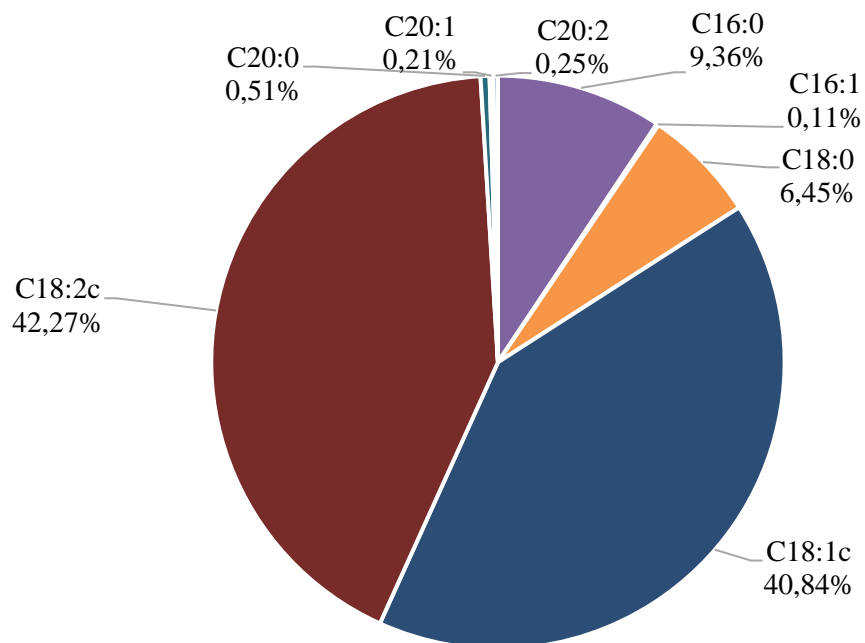
Obrázek 49: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – kmínový ze Soxthermu (O6)



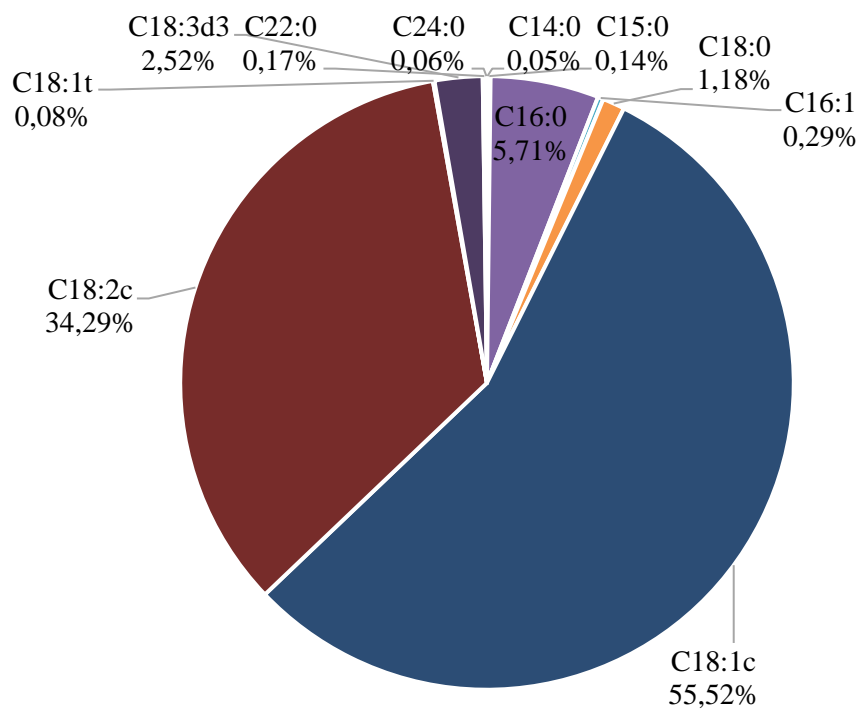
Obrázek 50: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – dýňový ze Soxthermu (O7)



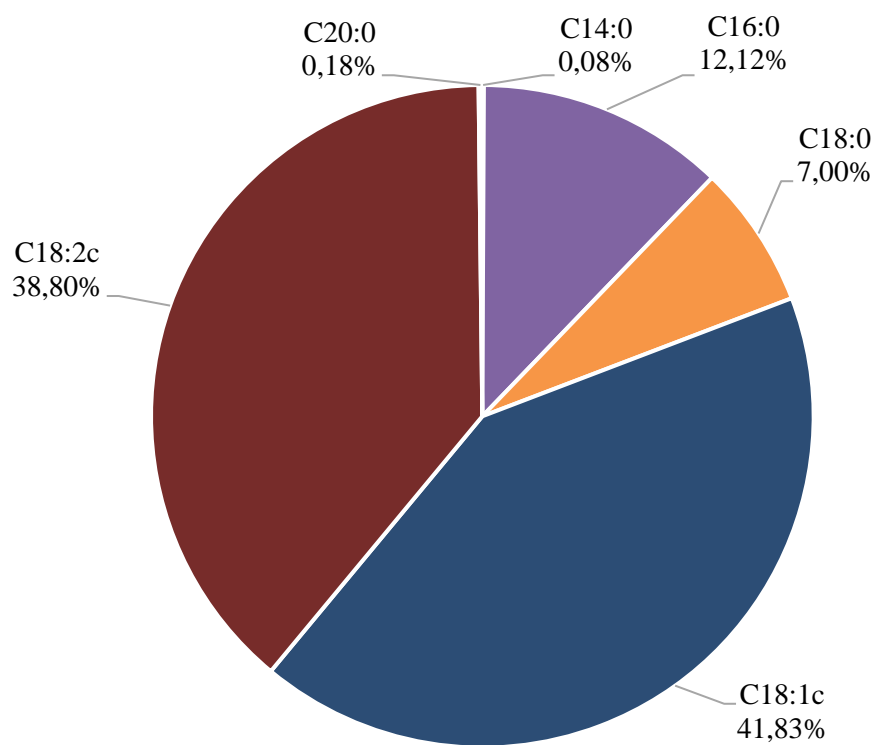
Obrázek 51: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – z lněných pokrutin ze Soxthermu (O8)



Obrázek 52: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – ze sezamových pokrutin po Soxthermu (O9)



Obrázek 53: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – z kmínových pokrutin ze Soxthermu (O10)



Obrázek 54: Profil mastných kyselin ve vzorku oleje – z dýňových pokrutin ze Soxthermu (O11)

Příloha 2 – Dotazník pro senzorickou analýzu



Dotazník pro senzorické hodnocení doplňků stravy

Vážení hodnotitelé,
zhodnoťte, prosím, předložené vzorky doplňků stravy.

Hodnotitel

Datum:

Čas:

Zdravotní stav (zakroužkujte): kuřák / nekuřák muž / žena

Věk:

- a) 0–15 let
- b) 16–25 let
- c) 26–35 let
- d) 35 a více

Jaké je Vaše stanovisko před ochutnáváním? (Čokoládové bonbóny)

- a) Čokoládové cukrovinky mám velmi rád/a
- b) Čokoládové cukrovinky nemám příliš rád/a
- c) Čokoládové cukrovinky nemám vůbec rád/a

Jaký máte vztah k enzymatickým preparátům?

- a) Enzymatické preparáty užívám často
- b) Enzymatické preparáty užívám občas
- c) Enzymatické preparáty vůbec neužívám

• *Senzorické hodnocení vzorků pomocí stupnice*

Senzoricky zhodnoťte (označte jako ve škole):

- 1. Vynikající
- 2. Velmi dobrá
- 3. Dobrá
- 4. Uspokojivá
- 5. Nevyhovující

Kód vzorku	Vzhled a barva	Chut'	Vůně	Konzistence	Celkové hodnocení
A					
B					
C					
D					

Konzistence (textura)
(hodnoťte při konzumaci)

Kód vzorku	Konzistence	Označte nejlepší vzorek	Označte nejhorší vzorek
A			
B			
C			
D			

1. Příliš měkká
2. Měkká
3. Ideální
4. Tvrdá
5. Příliš tvrdá (tuhá)

- **Pořadový test**

(seřad'te vzorky dle vlastních preferencí a případně uveďte poznámku k produktu)

Číslo pořadí	Kód vzorku	Poznámka